

Aus der Frauenklinik der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. habil. B. Gerber

Funktionelle Untersuchungen an
Trophoblastzellkulturen zur Prophylaxe
und Therapie der Präeklampsie
-
eine *in vitro* Studie

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(*Dr.med.*)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von Ferdinand Schumacher, geb. 14.09.1988 in Templin

aus Lychen

Rostock (2014)

1. Gutachter: **Prof. Dr. med. habil. V. Briesse, Universitätsfrauenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock**
2. Gutachter: **Prof. Dr. med. habil. H. Nizze , Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock**
3. Gutachter: **Univ.-Prof. Dr. med. B. Hüneke, Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin, Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf**

Datum der Einreichung: 20.06.2014

Datum der Verteidigung: 24.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Einleitung.....	6
1.1 Plazenta	6
1.1.1 Physiologische Plazentation	6
1.1.2 Funktion der reifen Plazenta.....	11
1.2 Präeklampsie.....	12
1.2.1 Definition, Epidemiologie, Risikofaktoren und klinische Präsentation	12
1.2.2 Theorien zur Pathogenese der Präeklampsie	13
1.2.3 Therapie der Präeklampsie.....	19
2 Zielsetzung	21
3 Material und Methode.....	22
3.1 Material	22
3.1.1 Plazentagewebe und Zellkulturen	22
3.1.2 Antibiotika und Antikoagulantien	22
3.1.3 Puffer und Lösungen	22
3.1.4 Chemikalien	24
3.1.5 Assays und Geräte.....	24
3.2 Methoden	26
3.2.1 Präparation der Trophoblastzellkulturen.....	26
3.2.2 Applikation der zu testenden Substanzen und Zellkultivierung.....	31
3.2.3 Mikroskopische Methoden, pH-Wert-Messung und Präparation der Zellkulturen für weitere Untersuchungen.....	32
3.2.4 Immunhistochemie.....	33
3.2.5 Bestimmung der extrazellulären Laktatdehydrogenase-Aktivität.....	34
3.2.6 Bestimmung des Glucosemetabolismus	35
3.2.7 Vitalitätstest.....	36
3.2.8 Bestimmung der Konzentration der löslichen fms-ähnlichen Tyrosinkinase-1	38
3.2.9 Statistische Analysen.....	39
4 Ergebnisse.....	40
4.1 Bestimmung und Entwicklung der Trophoblastzellen.....	40

4.2	Expression von löslicher fms-ähnlicher Tyrosinkinase-1	42
4.3	Hormonexpression der gebildeten Synzytien.....	45
4.4	Untersuchungen zum Zellmetabolismus,pH-Wert, Glucosekonzentration und Vitalitätstest	51
4.5	Zytotoxizität der getesteten Substanzen.....	54
5	Diskussion	56
6	Zusammenfassung	68
7	Thesen zur Promotionsschrift	70
8	Literaturverzeichnis	73
9	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	85
10	Anhang.....	89

Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
AT1-AA	Angiotensin Rezeptor 1 Autoantikörper
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
B-HCG	β -humanes Chorion Gonadotropin
BeWo	Humane Plazenta Choriokarzinom Zell-Linie
BP	Blutdruck
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CO	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNAse	Desoxyribonuclease 1
ETA	Endothelinrezeptor Typ A
ET-1	Endothelin 1
FKS	Fetales Kälberserum
Flt-1	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor-1
g	Gramm
GOD	1. Glucoseoxidase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulphonische) Säure
HIF-1	Hypoxie induzierter Faktor 1
HPSS	Hanks gepufferte Salzlösung
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardation
JAR	Humane Plazenta Choriokarzinom Zell-Linie

JEG-3	Humane Plazenta Choriokarzinom Zell-Linie
l	Liter
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
µl	Microliter
µg	Microgramm
µm	Micrometer
ml	Milliliter
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mmol/l	Millimol/Liter
NaCl	Natriumchlorid
NBCS	Neonatales Kälberserum
ng	nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pi3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3 Kinase
PIGF	Plazentärer Wachstumsfaktor
PDG	Thrombocytärer Wachstumsfaktor
PDE 5	Phosphodiesterase 5
pg	picogramm
SDS	Natriumdodecylsulfat
sEng	lösliches Endoglin
sFlt-1	lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
STOX1	storkhead-box Protein 1
TGF-β3	Umbildender Wachstumsfaktor β3
TNF-α	Tumor Nekrosefaktor-α
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor

VEGF-A	Unterform des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors
VEGFR	Rezeptor des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors
WHO	Welt Gesundheits Organisation
z.Bsp.	zum Beispiel
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Plazenta

1.1.1 Physiologische Plazentation

Die Plazenta dient als temporär angelegtes, fetales Stoffwechselorgan. Während der Schwangerschaft übernimmt es essentielle Funktionen in der Ernährung des Feten, des maternal-fetalen Stoff- und Gasaustausches und der Hormonproduktion.

Etwa am sechsten Tag nach der Befruchtung der Eizelle kommt es zur Implantation der aus der Eizelle entstandenen Blastocyste in der Uteruswand (Schumacher 1993). Ein bis zwei Tage später gliedert sich der Trophoblast, welcher die äußere Zellschicht der Blastocyste bildet, in Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast. Der Synzytiotrophoblast besteht aus den Trophoblastzellen die mit maternalem Gewebe in direkten Kontakt kommen und dort Synzytien ausbilden. Der mitotisch aktive Zytotrophoblast trägt zur Vergrößerung des Synzytiotrophoblasten bei, da sich dieser in einem Stadium der protrahierten Apoptose befindet und selbst mitotisch kaum aktiv ist (Lüllmann-Rauch 2006). Dieser Fakt erschwert die Kultivierung der Synzytiotrophoblastzellen. Die beiden Zellschichten sowie Teile des extraembryonalen

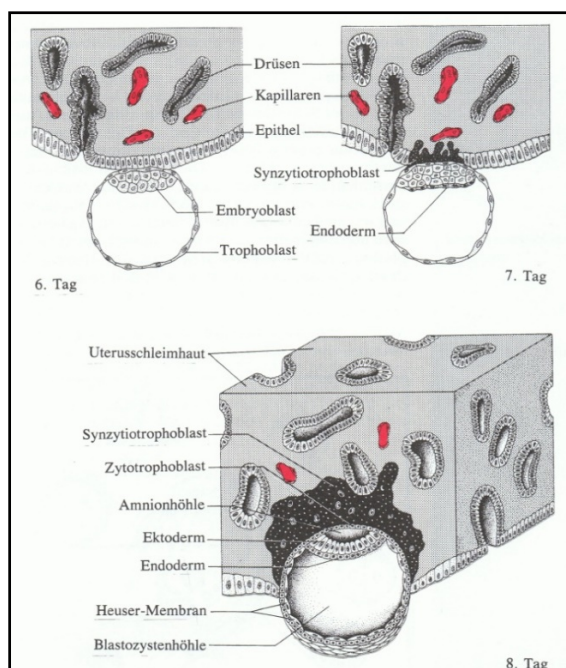


Abb. 1 Beginnende Proliferation der Trophoblastzellen in der Uteruswand modifiziert nach Schumacher 1993: S. 77.

Mesenchyms bilden in der weiteren Entwicklung den fetalen Anteil der Plazenta. In Abbildung (Abb.) 1 ist die beginnende Plazentation in der Uteruswand dargestellt.

In der zweiten Woche dringt der Synzytiotrophoblast tiefer in das Endometrium ein, wobei es zur Ausbildung von Lakunen kommt, die nach Kontakt und Eröffnung von maternalen Blutgefäßen von Blut umspült werden (Ulfig 2005) Etwa am 13. Tag sprießen erste Fortsätze, vom Trophoblasten ausgehend, in das Endometrium des Uterus ein (Schumacher 1993) Diese werden Primärzotten oder Villi (vergleiche Abbildung 2a) genannt und bestehen zunächst nur aus Epithelzellen des Zytotrophoblasten und aus dem Synzytiotrophoblasten. Sie ragen in die Lakunen hinein, weshalb dieser Raum nun als intervillöser Raum bezeichnet wird. (Ulfig 2005) Nach Einwachsen des extraembryonalen Randmesenchyms in diese Primärzotten werden sie als Sekundärzotten (Abb. 2b), und, sobald fetale Blutgefäße in diese Zotten einsprießen, als Tertiärzotten (Abb. 2c, d) definiert. Die Gefäße in den Zotten bilden Anastomosen mit dem fetalen Blutkreislauf und bilden so die Grundlange für die spätere Blut-Plazenta-Schranke.

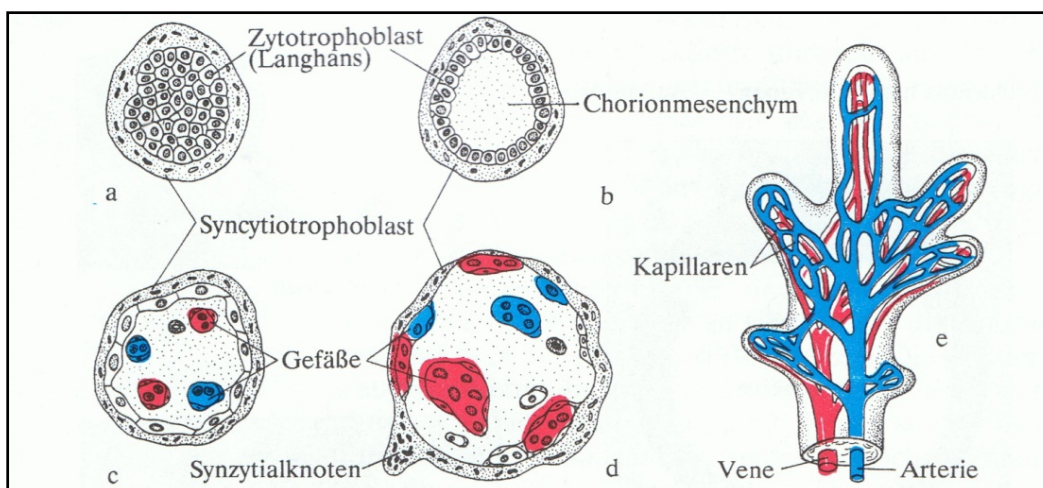


Abb. 2 Entwicklung der Zotten während der Plazentation aus Schumacher 1993: S. 126.

Ende der dritten Woche vermehren sich die Zytotrophoblastzellen stark und wachsen zu Zellsäulen aus (Schumacher 1993). Diese Säulen werden Haftzotten genannt und bilden eine Sonderform der Stammzotten. Sie vereinigen sich kurz darauf seitlich miteinander und bilden eine äußere Zytotrophoblastenschale. Der Teil des Endometriums, der nach der Implantation eine deziduale Reaktion erfährt wird fortan als Dezidua bezeichnet. Zytotrophoblastenschale, Dezidua und Gewebe des, an den intervillösen Raum grenzenden, Synzytiotrophoblasten bilden die Basalplatte der Plazenta. Von der mütterlichen Seite zugewandten Basalplatte wachsen in der weiteren Entwicklung Plazentasepten aus, die in den intervillösen Raum hineinragen. Diese Septen

unterteilen die Plazenta in zehn bis 40 becherförmige Areale, die Kotyledone (Ulfig 2005). Fetalwärts wird der intervillöse Raum von der Chorionplatte begrenzt, aus der die Zotten entstehen (siehe Abb. 3). Die Chorionplatte besteht aus Amnionepithel (Amnion = innerste Eihaut), Chorion, Bindegewebe, Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten.

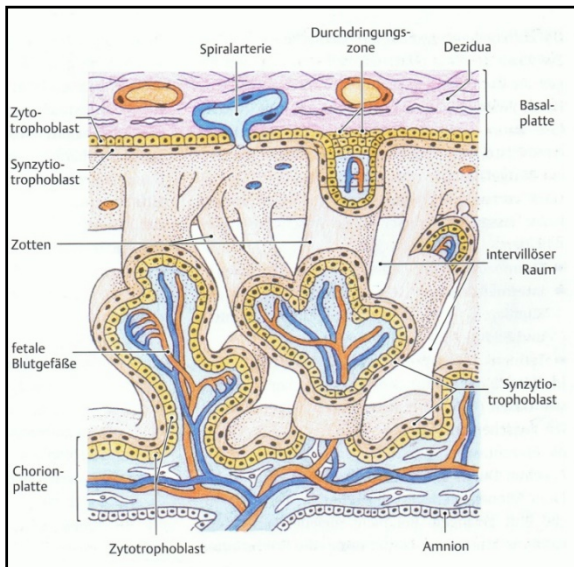


Abb. 3 Aufbau der Plazenta ca. in der vierten Woche aus Ulfig 2005: S. 35

Die Haftzotten der Zytotrophoblastenschale bedecken bis ca. zur achten Woche die komplette Oberfläche des Chorions. Dann bilden sich die dem Uteruslumen zugewandten Zotten zurück, während sich die am embryonalen Pol gelegenen Zotten weiterentwickeln. Der zottenfreie Teil des Chorions wird als Chorion laeve bezeichnet, während der zottenreiche Anteil zusammen mit der Chorionplatte das Chorion fondosum bildet, aus dem der fetale Anteil der Plazenta entsteht (Schumacher 1993). Abbildung 4 zeigt die makroskopische Ansicht der Plazenta in diesem Stadium.

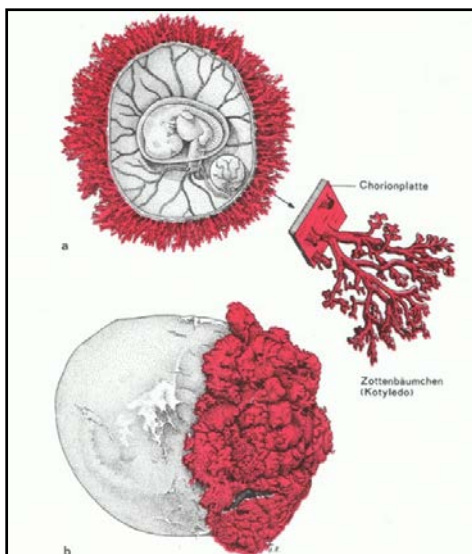


Abb.4 Makroskopische Ansicht der Plazenta (rot) aus Schumacher 1993: S. 127

Zwischen der Basal- und der Chorionplatte liegen die Zottenbäume und der intervillöse Raum. Wie in Abbildung 5 zu erkennen, ist der Zottenbaum stark verzweigt. Jede Plazenta besitzt

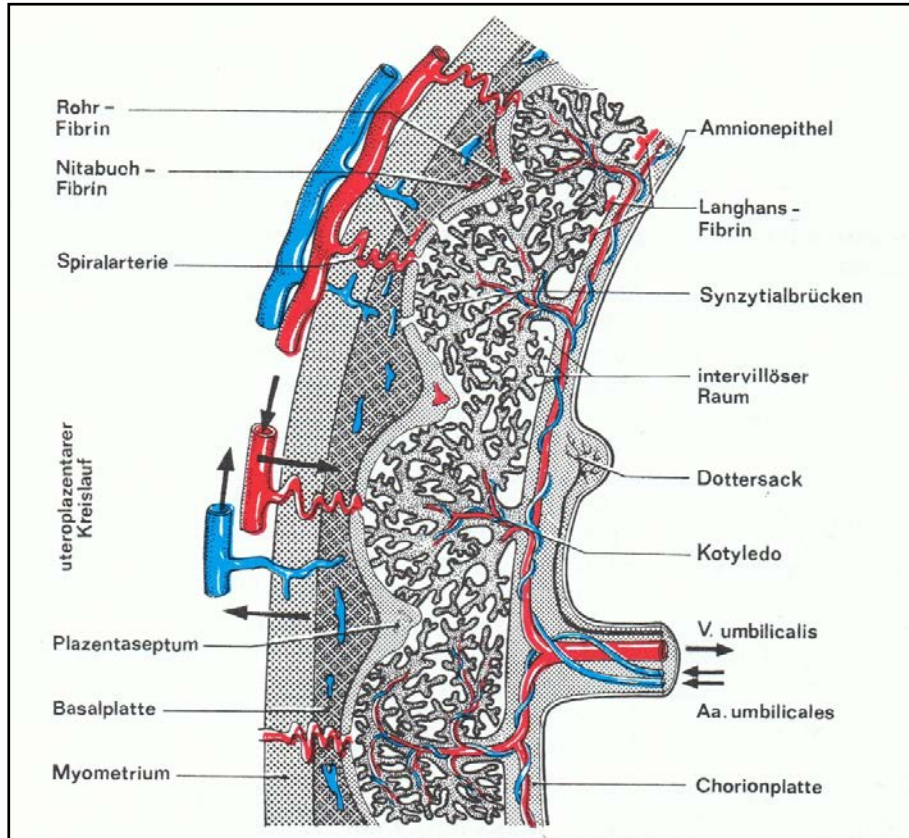


Abb. 5 Schematischer Überblick über die Plazenta aus Schumacher 1993: S. 129

zwischen 30 und 60 Zottenbäume die sich in Stammzotten mit fetalen Arterien und Venen, Intermediärzotten mit Arteriolen und Terminalzotten als Orte des Stoff- und Gasaustausches gliedern. Da der Synzytiotrophoblast alle Zotten überzieht, steht er kontinuierlich in direktem Kontakt mit dem mütterlichen Blut und stellt somit den wichtigsten Teil der Plazenta für Schutzfunktion und Hormonproduktion dar. Innerhalb der Zotten befindet sich das Zottenstroma welches unter anderem Hofbauer – Zellen enthält. Diese sind Teil des monozytären Phagozyten-Systems und sezernieren Zytokine, die die Zottenreifung steuern. Des Weiteren existieren Fibroblasten zur Bildung der Interzellulärsubstanz und Myofibroblasten zur Aufrichtung der Zotten. Im Verlauf der Plazentareifung bildet sich der Zytotrophoblast immer mehr zurück. Es finden sich nur noch einzelne Zytotrophoblastzellen, die so genannten Langerhanszellen, in den Zotten. All diese verschiedenen Zelltypen gilt es, bei der später beschriebenen Isolation der Trophoblastzellen zu separieren. Außerdem schrumpft in der weiteren Plazentareifung der

intervillöse Raum, durch eine Anhäufung von Terminalzotten und auch die Plazentaschranke reduziert sich von sechs Schichten auf drei (Synzytiotrophoblast → verschmolzene Basalmembranen → Endothel der fetalen Kapillare). Dies ermöglicht einen effizienteren Stoffaustausch (Ulfig 2005). An Stellen, an denen der Synzytiotrophoblast aufgrund fehlender Unterstützung des Zytotrophoblasten bereits zugrunde gegangen ist, findet sich in der reifen Plazenta Fibrinoid, das dem Fibrin des Blutes ähnelt und als Defektabdeckung und zur Stabilisation dient. Außerdem zeigen die reifen Plazentazotten so genannte Synzytialknoten (Abb. 6b). Diese bestehen aus apoptotischen Synzytiotrophoblasten, welche in den Blutkreislauf der Mutter abgegeben und später in der Lunge phagozytiert werden (Ulfig 2005).

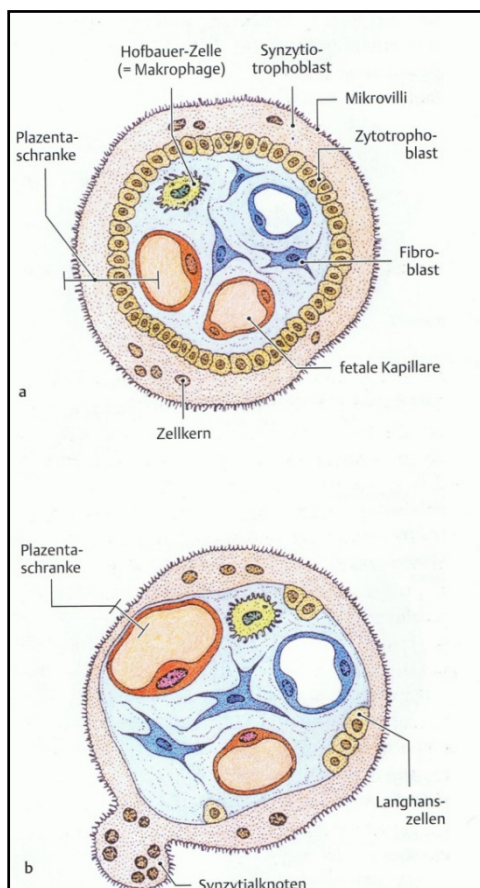


Abb. 6 Zottenquerschnitt von Zotte bis zum 4. Monat (a) und einer Zotte im 4. Monat (b) aus Ulfig 2005: S. 37

Die geborene Plazenta ist fetal von Amnion und maternal von Dezidua bedeckt. Die Unterteilung in die einzelnen Kotyledonen ist meist gut zu erkennen. Die reife Plazenta wiegt ungefähr 500 Gramm (g) und hat je nach Verlauf der Schwangerschaft und der Konstitution der Mutter einen Durchmesser von etwa zwei Handflächen (Lüllmann-Rauch 2006). Wie in Abbildung 7 zu erkennen, hat sie eine diskoidale Form und ähnelt in etwa einem flachen Topf.

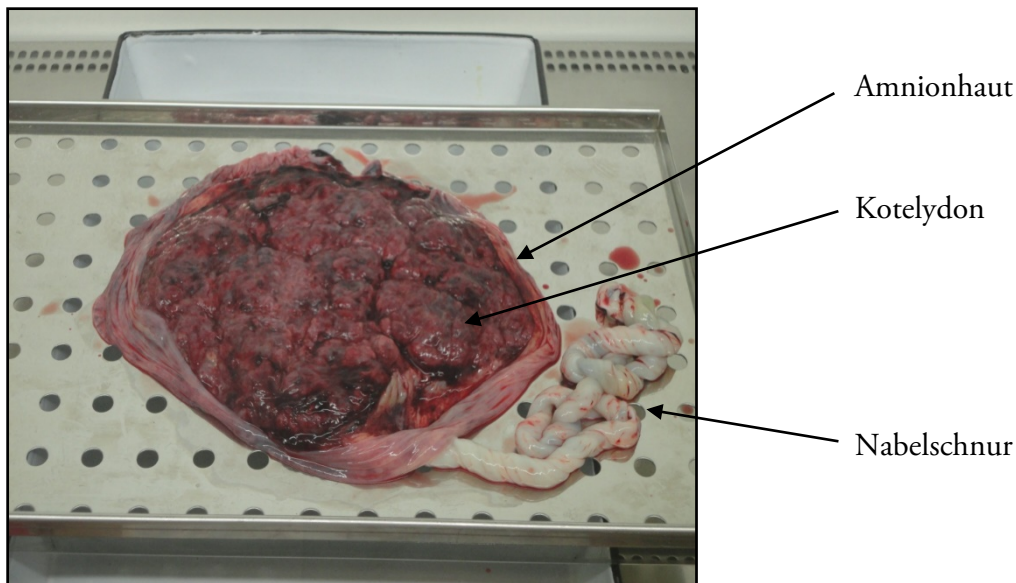


Abb. 7 Plazenta kurz nach der Geburt mit Blick auf den maternalen Anteil, Foto: F. Schumacher 2012

1.1.2 Funktion der reifen Plazenta

Die Plazenta dient zum Stoffaustausch zwischen maternalen und fetalem Blut (Abb. 5). Die Plazentaschranke fungiert hierbei als Diffusionsbarriere zwischen den Kreisläufen. Für die Applikation jeglicher Medikamentation während der Schwangerschaft ist das Wissen über die Fähigkeit der plazentären Passage und der damit verbundene Einfluss auf den Feten von höchster Bedeutung. Gase und hydrophobe Moleküle diffundieren passiv durch die Trennschichten (frühe Plazentaschranke: Synzytiotrophoblast → Zytotrophoblast → Basallamina → Mesenchym → Basallamina der fetalen Kapillare → Endothel) hindurch, während hydrophile Moleküle von der Plasmamembran des Synzytiotrophoblasten zurückgehalten werden (Lüllmann-Rauch 2006). Der Synzytiotrophoblast ist jedoch selektiv für einige physiologisch hydrophile Moleküle durch membranständige transporter- und rezeptorvermittelte Transzytose durchgängig. Zu diesen Molekülen gehören zum Beispiel Aminosäuren, Glucose und Antikörper(IgG). Generell gilt, dass die Plazentaschranke etwas weniger durchlässig ist als die Blut-Hirn-Schranke und daher nur eine eingeschränkte Schutzfunktion besitzt.

Außer diesen Funktionen besitzt die Plazenta, genauer der Synzytiotrophoblast, die Eigenschaft der Hormonproduktion (Lüllmann-Rauch 2006). Zu diesen Hormonen zählen Humanes Choriongonadotropin beta (β -HCG; Aufrechterhaltung des Corpus luteum, immunsuppressive Wirkung), Östrogene wie Östradiol (Wachstum des Uterus und der Brustdrüse), Progesteron

(Differenzierung und Aufrechterhaltung der Dezidua, Ruhigstellung des Myometriums, Differenzierung der Brustdrüse) und Chorion-Somatotrophin (Erhöhung des maternalen Stoffwechsels und somit reicheres Nährstoffangebot für den Feten). Darüber hinaus bildet der Synzytiotrophoblast noch eine Vielzahl von weiteren Produkten, zum Beispiel das β 1-Glykoprotein (Kliman 1986), Kollagenasen (Moll 1990), Plasminogen-Aktivator (Feinberg 1989), Thrombomodulin (Maruyama 1985) und Fibronektin (Feinberg 1991).

1.2 Präeklampsie

1.2.1 Definition, Epidemiologie, Risikofaktoren und klinische Präsentation

Präeklampsie ist definiert als Gestationshypertonie (BP $\geq 140/90$ mmHg) und Proteinurie (Eiweißausscheidung ≥ 300 mg/24h nachgewiesen im 24-Stunden-Sammelurin oder ≥ 30 mg/mmol Protein-Kreatin-Ration im Spontanurin) der Mutter nach der abgeschlossenen 20. Gestationswoche (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2013). Heutzutage steht der diagnostische Wert der Proteinurie und die damit einhergehende Ödembildung zur Diskussion. Kritisiert werden hier unzureichend durchgeführte klinische Untersuchungen und ein Mangel an randomisiert, kontrollierten Studien (Lindheimer 2010). Unverzichtbar für die Diagnosefindung sind weiterhin die klinische Symptomatik und das Ergebnis einer Duplex-Sonographie der Uterusarterien.

Präeklampsie ist einer der Hauptgründe für maternale und perinatale Morbidität und Mortalität weltweit. Insgesamt tritt Präeklampsie in etwa 3 % aller Schwangerschaften auf und ist für 12 % aller maternalen Todesfälle im Verlauf der Schwangerschaft verantwortlich (World Health Organisation 2005). Sie tritt am häufigsten, mit einer Wahrscheinlichkeit von 7,5 % bei gesunden Erstgebärenden auf (Young 2010). Genetische Faktoren wie etwa die Erhöhung des Risikos, an Präeklampsie zu erkranken, wenn diese in der Familie des Vaters auftrat (Esplin 2001), können einen Einfluss nehmen. Das Risiko an Präeklampsie zu erkranken wird ebenfalls durch diverse Begleiterkrankungen erhöht. Zu diesen gehören bereits bestehender Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen, das metabolische Syndrom, Störungen der Blutgerinnung (Barton 2008; Duckitt 2005; Sibai 2005) sowie andere Schwangerschaftskomplikationen, zum Beispiel multifetale Gestation und Hydatiformes Mol (Bdolah 2008; Koga 2010). Das Alter der

Schwangeren scheint ebenfalls Einfluss auf die Pathogenese der Präeklampsie zu nehmen (Duckitt 2005; Sibai 2005).

Häufig auftretende und zum Teil lebensbedrohliche Komplikationen, die durch den Bluthochdruck verursacht werden können, sind Lungenödem, akutes Nierenversagen, Krampfanfälle und Hyperreflexie. Präeklampsie hat in jeder Schwangerschaft das Potential sich zu krampfartigen Anfällen (Eklampsie) oder dem HELLP-Syndrom (**h**aemolysis = Hämolyse, **e**levated **l**iver **e**nzymes = Leberparenchymschaden und **l**ow **p**latlet = Thrombocytopenie) zu entwickeln (Sibai 1993).

1.2.2 Theorien zur Pathogenese der Präeklampsie

Bereits 1939 publizierte E. W. Page, dass Präeklampsie sehr wahrscheinlich vom einem plazentären Defekt verursacht wird (Page 1939). Des Weiteren zeigten diverse Studien, dass nur eine vollständige Entfernung der Plazenta aus dem Uterus ein Abklingen der Symptome bewirken kann (Shembrey 1995; Matsuo 2007). Daher kann die Plazenta relativ sicher als Verursacher der Präeklampsie ausgemacht werden. Jedoch konnte, trotz intensiver Forschung, die genaue Pathogenese noch nicht geklärt werden. Die Präeklampsie bleibt eine Erkrankung der Theorien (Dekker 1998). Im Folgenden soll ein Überblick zum momentanen Erkenntnisstand geben werden.

Im Wesentlichen werden in der Forschung nach der Ursache der Präeklampsie zwei Fragen gestellt:

1. Warum kommt es zu einer Fehlentwicklung der Plazenta, die zu Präeklampsie führt?
2. Welchen Einfluss hat diese Fehlentwicklung auf den mütterlichen Kreislauf?

Die Antwort auf die erste Frage liegt zum einen in einer Störung des vaskulären Umbaus der Spiralarterien des Uterus. Zum anderen ist auch eine grundsätzliche maternale endotheliale Dysfunktion dafür verantwortlich. Wie bereits beschrieben, kommt es im Prozess der Plazentation zur Einwanderung von Zytotrophoblastzellen in das maternale Endometrium. Dort ersetzen diese das Endothel der endometrialen Gefäße, was zu einer Vergrößerung der Durchlässigkeit und des Durchmesser führt (Brosens 1972). Dieser Vorgang wird Pseudovaculogenesis genannt. Bei der Präeklampsie findet diese Transformation nur unzureichend statt (Kumar 1962; Robertson 1967).

Es kommt zu einer Minderperfusion und Ischämie der Plazenta. Was genau die Synzytiotrophoblastzellen daran hindert, auf adäquate Weise in die Spiralarterien des Uterus einzuwandern, ist noch unklar. Es könnte mit der gesteigerten Synthese des Hypoxie induzierten Faktors 1 (HIF-1) während der präeklampsischen Erkrankung in Verbindung stehen. HIF-1 inhibiert Wachstumsfaktoren, wie etwa den umbildenden Wachstumsfaktor $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), die die Zytotrophoblastinvasion fördern (Caniggia 2000). Da HIF-1 von der ischämischen Plazenta selbst produziert wird, kann eine positive Rückkopplung entstehen. Ferner konnte eine verminderte Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF-A, PlGF und VEGFR-1 (Flt-1) durch die präeklampsische Plazenta gezeigt werden (Zhou 2002).

Die vorherrschende endotheliale Dysfunktion ist bei präeklampsischen Frauen meist nicht nur auf die Schwangerschaft beschränkt (Irgens 2001; Smith 2001). Bei Frauen mit Präeklampsie sind verschiedene Veränderungen der Serumspiegel von Proteinen, welche Einfluss auf die endotheliale Funktion nehmen, bekannt. Davon betroffen sind z. Bsp. das von-Willebrand-Antigen (Calvin 1988), zelluläres Fibronektin (Lockwood 1990), lösliche Gewebefaktoren, lösliches E-Selektin, der thrombozytäre Wachstumsfaktor (PDGF) und Endothelin (Nova 1991). Des Weiteren existieren Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress (Davidge 1998) und gesteigerte Thrombozytenaktivierung (Kolben 1995). Ursächlich können diese Veränderungen nicht zufrieden stellend geklärt werden. Allerdings spielen hier wohl ebenfalls genetische Faktoren eine Rolle. So zeigten Studien ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko für schwere Präeklampsie bei nahen Verwandten (Carr 2005). Außerdem konnte ein signifikant höheres Risiko für Präeklampsie in Schwangerschaften festgestellt werden, in denen der Vater bereits mit einer anderen Partnerin ein Kind aus einer präeklampsischen Schwangerschaft hatte (Tubbergen 1999). Hier wird vor allem das Augenmerk auf das paternale storkhead-box Protein 1-Gen (STOX1-Gen) gelegt, das mit erhöhtem Präeklampsierisiko assoziiert wird (van Dijk 2005; van Berends 2007; Kivinen 2007; George 2013). In einer Meta-Analyse identifizierte kürzlich eine niederländische Arbeitsgruppe sieben Genvarianten, die gesichert mit Präeklampsie assoziiert werden konnten (Buurma 2013). Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass es viele Gründe für eine fehlentwickelte Plazenta geben kann. Das Resultat dieser unvollkommenen Genese ist jedoch fast ausschließlich eine plazentären Ischämie.

Wie führt diese Ischämie zu maternaler Hypertonie? Die ischämische Plazenta, vornehmlich der Synzytiotrophoblast, produziert eine Reihe von löslichen Faktoren die direkt in das mütterliche Blut gelangen und somit den mütterlichen Kreislauf beeinflussen können. Der in vielen Studien und auch in dieser Arbeit untersuchte Faktor lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1 (sFlt-1), scheint dabei von wesentlicher Bedeutung zu sein. sFlt-1 wird von der ischämischen Plazenta, genauer dem Synzytiotrophoblasten, produziert. Dies geschieht unter anderem unter dem Einfluss von HIF-1 (George 2011). Des Weiteren spielt für die sFlt-1 Produktion die Aktivierung von mütterlichen Immunreaktionen eine Rolle. Plasmalevel der inflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Tumor Nekrosefaktor- α (TNF- α) sind in präeklampsichen Schwangerschaften erhöht (Murphy 2013). Darüber hinaus bewirkt die Administration von TNF- α -bindenden Antikörpern eine Verringerung der präeklampsichen Symptome im Tiermodell (Gilbert 2008). Eine weitere

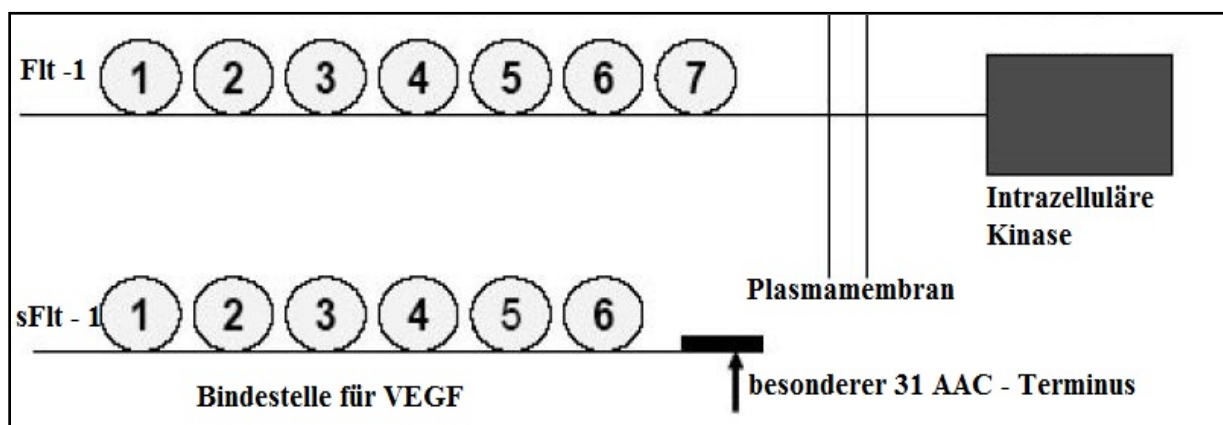


Abb. 8 molekulare Unterschiede zwischen Flt-1 und sFlt-1 modifiziert nach Maynard 2005

Komponente des mütterlichen Immunsystems in der sFlt-1 Produktion scheint das Auftreten von Antikörpern gegen den Angiotensin-1-Rezeptor zu sein. Es konnte eine hohe Korrelation zwischen diesen AT1-AA und dem sFlt-1 Plasmalevel erfasst werden (Zhou 2008; Vitoratos 2012). sFlt-1 zirkuliert aufgrund fehlender transmembraner Domäne im Blut der Mutter (Maynard 2003; Venkatesha 2006) und wirkt intravasal als kompetitiver Inhibitor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF). VEGF wird von sFlt-1 kompetitiv gebunden und verliert so die Möglichkeit selbst an den VEGF-Rezeptor zu binden (Wu 2010). sFlt-1 agiert somit als Antagonist des VEGF-Rezeptors Flt-1. Es besitzt zwar die Bindestelle für VEGF, hat jedoch, durch eine veränderte Aminosäurestruktur, keine Verbindung zur intrazellulären Effektorkinase (Abb. 8).

VEGF ist essentiell für die physiologische Entwicklung des Endothels. Eine Inaktivität von VEGF führt daher zur maternalen endothelialen Dysfunktion, die über einen Anstieg von NO und

Endothelin-1 schlussendlich den Hypertonus der Mutter verursacht (George 2011). Darüber hinaus konnte eine präeklampsieartige Symptomatik in knockout-Mäusen unter VEGF-Antikörpergabe gezeigt werden (Zhu 2007). Eine eindeutige Korrelation zwischen dem maternalen sFlt-1-Level und dem Auftreten der Präeklampsie kann bereits im mütterlichen Blut während der asymptomatischen Phase der Krankheit festgestellt werden. Daher kann sFlt-1 als Früherkennungsmarker der Präeklampsie genutzt werden (Levine 2006). Des Weiteren wurde die Verbindung von sFlt-1 und Präeklampsie in zahlreichen weiteren Studien untersucht. So stellt der Quotient von sFlt-1 und dem plazentären Wachstumsfaktor (PIGF) ebenfalls eine geeignete Methode zur Früherkennung dar (Bushimschi 2005; Verloren 2012). Eine Korrelation der sFlt-1-Konzentrationen im mütterlichen Blut und der PIGF-Spiegel konnte mehrfach nachgewiesen werden (Lam 2005; Verloren 2012). PIGF fällt im Verlauf von präeklampsischen Schwangerschaften stark ab. Es bindet an einen ähnlichen Rezeptor wie VEGF und wirkt ebenfalls proangiogenetisch (Levine 2005). Daher liegt eine gleichzeitige Reduktion von PIGF und VEGF durch sFlt-1 nahe. Administration von sFlt-1 via direkter Infusion führte zu den Symptomen der Präeklampsie in Ratten und Mäusen (Maynard 2003; Bridges 2009). Weitere plazentäre Ischämie simulierende Tiermodelle zeigten einen deutlichen Anstieg von sFlt-1 in mütterlichem Blut (Gilbert 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Applikation von VEGF oder von Peptiden die sFlt-1 binden, präeklampsische Symptome reduziert (Gilbert 2010; Bergmann 2010). Abbildung 9 stellt die Auswirkungen von sFlt-1 auf VEGF und PIGF und die damit einhergehende Rolle von sFlt-1 in der Pathogenese der Präeklampsie dar.

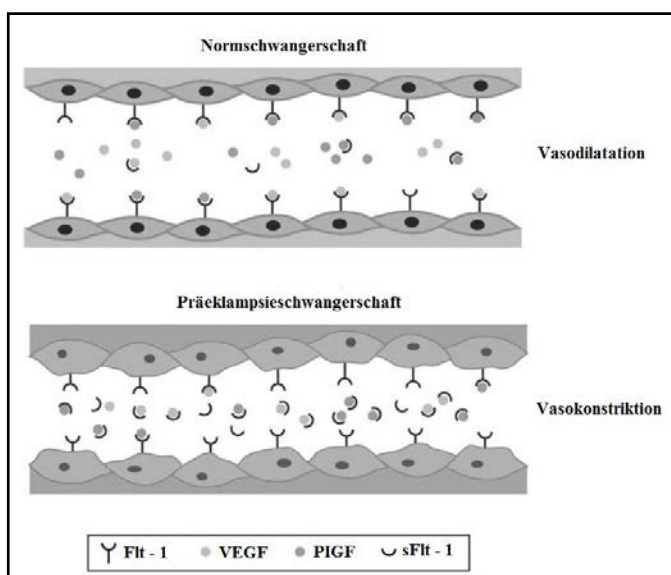


Abb. 9 Wirkmechanismus von sFlt-1 modifiziert nach Yuan 2000). Das frei intravasal zirkulierende Protein sFlt-1 bindet über die, dem flt-1 ähnliche, Bindungsstelle die proangiogenetischen Faktoren PIGF und VEGF. Es kommt zu einer kompetitiven Inhibition dieser Faktoren, da sFlt-1 keine intrazelluläre Kinaseaktivität induziert, d.h. zur Vasokonstriktion.

Abschließend sei noch auf die Rolle von Endoglin in der Pathogenese der Präeklampsie hingewiesen. Dieses Protein der TGF- β -Familie befindet sich bei schweren Verläufen der Präeklampsie vermehrt auf der Zellmembran der Synzytiotrophoblastzellen und lässt sich in hoher Konzentration in seiner löslichen Form (sEng) im Blut der Mutter nachweisen. Der Effekt dieser erhöhten Konzentration ist ähnlich dem des sFlt-1. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt, jedoch scheint die antiangiogenetische Wirkung auf eine Inhibition des TGF- β 1-Signalweges zurückzuführen zu sein (Venkatesha 2006; Levine 2006).

Abbildung 10 gibt einen Überblick zum aktuellen Stand der Forschung bezogen auf die Pathogenese der Präeklampsie.

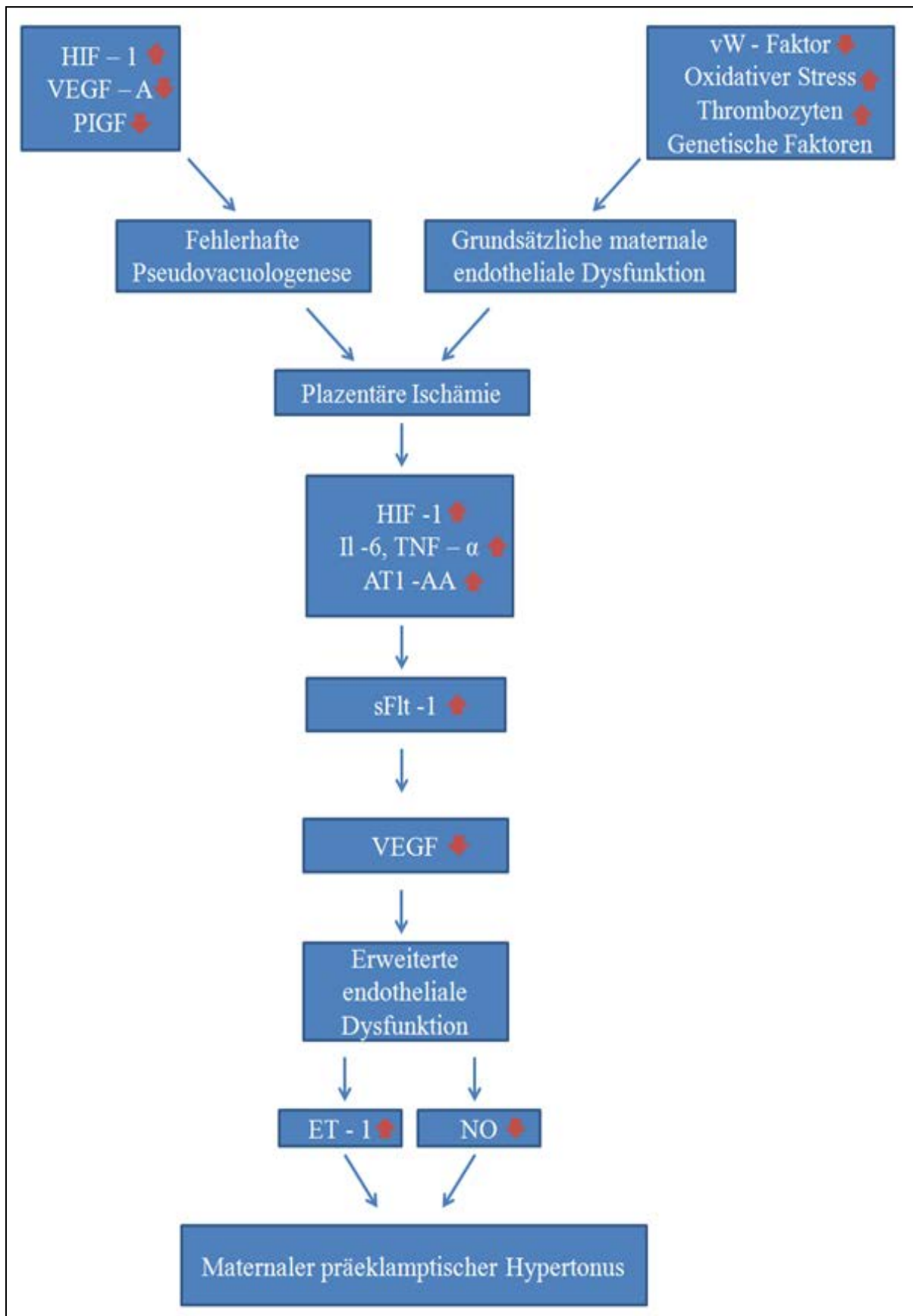


Abb. 10 Übersicht über die Pathogenese der Präeklampsie mit Fokus auf das Protein sFlt -1 (lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1), HIF-1 = Hypoxie induzierter Faktor 1, VEGF-A = Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor, PlGF = Plazentärer Wachstumsfaktor, vW-Faktor = von Willebrand Faktor, IL-6 = Interleukin 6, TNF- α = Tumornekrosefaktor α , AT1-AA = Angiotensin Rezeptor 1 Autoantikörper, ET-1 = Endothelin 1, NO = Stickstoffmonoxid

1.2.3 Therapie der Präeklampsie

Den aktuellen Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga e.V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe folgend, sollte die hypertone, präeklampsische Schwangere bis zu Blutdruckwerten $<150/100$ mmHg nicht medikamentös behandelt werden. Eine Ausnahme bildet das Vorliegen von Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus oder eine schon vorher bestehende renale Hypertonie. Bei Therapiebeginn unterhalb der angegebenen Blutdruckwerte, kann es durch die medikamentöse Blutdrucksenkung zu einer fetalen Wachstumsbeeinträchtigung kommen (de Swiet 2000). Ab systolischen Werten von >170 mmHg und/oder diastolisch 110 mmHg ist der medizinische Notfall indiziert, welcher mit Nifedipin per os oder Urapidil intravenös behandelt werden sollte. Dihydralazin ist in Deutschland ebenfalls zur antihypertensiven Therapie der Schwangeren zugelassen, weist aber ein höheres Nebenwirkungsspektrum als Urapidil auf (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2013). Als Langzeittherapie empfehlen sich α -Methyldopa, β -Blocker (vor allem Metoprolol) und Calciumantagonisten. ACE-Inhibitoren und AT-1-Antagonisten sind aufgrund embryo- und fetotoxischer Effekte kontraindiziert (Cooper 2006). Da das Plasmavolumen durch die Präeklampsie reduziert wird, sind Diuretika nicht indiziert (Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL - Deutsche Hypertonie Gesellschaft 2008), können jedoch bei aufgetretendem Lungenödem oder Herzinsuffizienz der Mutter angewendet werden (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2013). Magnesiumsulfat i.v. zeichnet sich als effektives Mittel zur Behandlung und Prävention der Präeklampsie begleitenden Krampfanfälle aus (Altman 2002), jedoch kann es bei gleichzeitiger Calciumantagonistgabe zu einer schweren Hypotonie kommen (Magee 2005). Als kausale Therapie der Wahl ist die vorzeitige Entbindung jedoch das einzige therapeutische Mittel bei Progression der Präeklampsie zu Eklampsie oder HELLP-Syndrom (Steegers 2010). In der Vergangenheit wurden außerdem präventive Maßnahmen ergriffen um der Präeklampsie vorzubeugen. Dazu zählten unter anderem die Supplementation von Calcium (Atallah 2000) oder Fischöl (Olsen 2000) und auch die niedrig dosierte Gabe von Acetylsalicylsäure (Knight 2000), die jedoch keine reproduzierbaren Vorteile für Mutter und Fetus erzielen konnten (Rotchell 1998).

Darüber hinaus existieren verschiedene Ansätze der Präeklampsitherapie die Gegenstand aktueller Studien sind. So konnte gezeigt werden, das Sildenafil Potential in der symptomatischen

Behandlung der Präeklampsie besitzt (Downing 2010). Sildenafil ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase 5 (PDE5). Dieses Enzym konnte auf der maternalen Seite der uteroplazentären Anlage nachgewiesen werden (Coppage 2005) und wirkt dort vasokonstriktorisch. In klinischen Studien zeigte sich kein negativer Effekt auf den Feten, jedoch blieb der Einfluss auf die Präeklampsiesymptomatik gering (Samangaya 2009). Des Weiteren wird die Wirkung der Hämoxygenase-1 (HO-1) diskutiert. Das Endprodukt der HO-1, Bilirubin, ist ein starkes Antioxidans, welches dem bei der Präeklampsie auftretenden oxidativen Stress entgegen wirkt. Ferner wird eine direkte Reduktion der Plasmalevel von AT 1-AA und sFlt-1 durch die HO-1 vermutet (Cao 2009). Eine dritte mögliche pharmakologische Interventionsmethode stellt die Verringerung der Endothelin-1-Wirkung über eine ET_A-Rezeptorblockade dar. Besonders in der späteren Gestationsperiode konnten hier Ergebnisse erzielt werden, die auf eine gute Therapieoption für Präeklampsie schließen lassen (Taniguchi 2003). Jedoch konnte an Mäusen, die mit ET_A-Rezeptorantagonisten behandelt wurden, eine Reihe von fetalen Entwicklungsstörungen bis hin zum neonatalen Tod beobachtet werden (Clouthier 1998). Ein möglicher negativer Einfluss auf die fetale Entwicklung beim Menschen ist daher nicht auszuschließen. Zusätzlich zur pharmakologischen Therapie existiert seit 2011 ein mechanischer Therapieansatz der Präeklampsie. Hierbei wird versucht mittels Apherese des mütterlichen Plasmas unter Verwendung von negativ geladenen Dextransulfat-Cellulosesäulen sFlt-1 aus dem Blut der Mutter zu filtrieren und so die Symptome der Präeklampsie zu verringern (Ravi 2011). Um die Wirksamkeit dieses Verfahrens zu verifizieren, bedarf es jedoch noch weiterer klinischer Studien. Der erstaunlichste Fakt in der Präeklampsieforschung ist wohl die Tatsache, dass Nikotin-Konsum der Mutter scheinbar zu einer Verringerung des Präeklampsierisikos führt (Lindqvist 1999; Conde-Agudelo 1999). Ob allein das Nikotin oder andere Bestandteile des Rauchens dafür verantwortlich sind, wird aktuell, zum Teil auch in dieser Arbeit, untersucht. Es gibt sowohl Hinweise auf nichtnikotinische (Wikstrom 2010) als auch auf nikotinische Bestandteile des Rauches als Ursache (Kwon 2010).

2 Zielsetzung

Präeklampsie stellt eine große Herausforderung für die Gynäkologie und Perinatalmedizin dar. Eine kausale Therapie konnte bislang nicht gefunden werden. Ein Parameter, dessen Anstieg im mütterlichen Blut signifikant mit erhöhtem Präeklampsierisiko assoziiert wird und direkten Einfluss auf die Pathogenese der Präeklampsie nimmt, ist die lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1 (sFlt-1). Diese Kinase wird von plazentären Trophoblastzellen gebildet. Ziel dieser Arbeit war es daher, humane Trophoblastezellen *in vitro* zu kultivieren und den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Expression von sFlt-1 zu untersuchen. Als Zielstellung galt weiterhin, eine Substanz, die gleichzeitig den sFlt-1-Spiegel senken könne und die Trophoblastenfunktion *in vitro* unbeeinträchtigt lasse, zu identifizieren. Eine solche Substanz könne dann für eine eventuelle *in vivo* Prophylaxe und Therapie der Präeklampsie genutzt werden. Bei den untersuchten Substanzen handelte es sich um (+/-)-Nikotin, Acetylsalicylsäure und das Glukokortikoid Triamcinolon. Zigarettenrauchen wurde bereits in diversen Studien mit einer signifikanten Reduzierung des Präeklampsierisikos in Verbindung gebracht. Ob dies ursächlich durch Nikotin bedingt ist, konnte bislang nicht eindeutig bewiesen werden. In dieser Studie sollte daher explizit der Einfluss des Nikotins auf Trophoblastzellen beleuchtet werden. Acetylsalicylsäure (ASS) stand in der Vergangenheit als therapeutisches Mittel gegen Präeklampsie im Fokus der Forschung und wurde wie keine zweite Substanz zur Thematik untersucht. Den Einfluss der ASS auf den Faktor sFlt-1 wurde bislang jedoch nicht untersucht und daher wurde ASS für die Arbeit ausgewählt. Die Plazenta stellt ein glucokortikoidsensitives Organ dar. Triamcinolon findet während der Schwangerschaft bislang Anwendung bei Frauen mit Frühgeburtsrisiko und bei Feten mit kongenitaler Nebennierenhyperplasie. Ein Einfluss auf Trophoblastzellen wäre daher möglich. Um der Fragestellung nach der eventuellen Schädlichkeit der Substanzen für die kultivierten Trophoblastezellen nachzugehen, wurden weiterhin adequate Funktions- und Vitalitätsteste durchgeführt. Hierzu sollten die Messung der gebildeten Hormonkonzentrationen, pH-Wert Messungen, lichtmikroskopische Überprüfungen, Messung der Glucosekonzentration und der extrazellulären LDH-Aktivität, sowie enzymatische Vitalitätsteste zählen. Schlussendlich ging diese Arbeit auch der Frage nach, ob sich der Einfluss der getesteten Substanzen auf Kulturen aus Norm- oder Präeklampsieschwangerschaften unterscheidet. Hierzu wurden Versuchsreihen aus entsprechendem plazentärem Gewebe untersucht.

3 Material und Methode

3.1 *Material*

3.1.1 Plazentagewebe und Zellkulturen

Als Grundlage zur Herstellung der verwendeten Trophoblastzellkulturen dienten insgesamt acht Plazenten. Alle verwendeten Plazenten stammten aus dem dritten Schwangerschaftstrimenon und waren Termingeburten. Sieben Plazenten waren dabei Normschwangerschaften zuzuordnen. Bei der achten Plazenta handelte es sich ebenfalls um eine Termin-Plazenta, jedoch stammte diese von einer Patientin mit diagnostizierter Präeklampsie. Sämtliche Plazenten wurden vor der Präparation von Geburtshelfern auf ihre Vollständigkeit überprüft. Die Daten aller Mütter sind bekannt und stehen für potentielle weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Die aus der Präparation der Plazenten hervorgegangenen Trophoblastzellkulturen wurden unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) 72 Stunden (h) im Brutschrank inkubiert.

3.1.2 Antibiotika und Antikoagulantien

- Amphotericin B (Fungizone, 250 UGML)
Firma: GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin-Solution (10.000 Einheiten Penicillin und 10 Miligramm (mg) Streptomycin/ml 0,9 % Natriumchlorid(NaCl))
Firma: Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Heparin-Natrium-250.000-ratiopharm (Heparin-Natrium 250.000 IE/10 ml H₂O)
Firma: Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

3.1.3 Puffer und Lösungen

- **Puffer**
 - PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung), 10 mmol/l, pH = 7,4

(8,0 g NaCl+ 2,9 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 0,2 g NaH₂PO₄ + 0,2 g KCl / 1,0 Liter

(l) Aqua dest.

- HBSS-Hepes-Puffer (1x), pH = 7,4

(50 ml HBSS (10x) + 0,2979 g Hepes (25 mmol/l) + 450 ml Aqua dest.)

- DMEM-Hepes-Puffer = Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium, pH = 7,4
(13,4 g DMEM + 2,6 g Hepes + 3,0 g NaHCO₂)

Firma: Biochrom KG, Berlin, Deutschland

➤ Lösungen

- 0,9 %-ige NaCl-Lösung (physiologische Kochsalzlösung, 9,0 g / 1,0 l Aqua dest.)

- 2,7 % - ige NaCl - Lösung (Kochsalzlösung. 2,7 g / 1,0 l Aqua dest.)

- HBSS (1x) = Hanks gepufferte Salzlösung,

Firma: Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

- NBCS = Neonatales Kälberserum ,

Firma: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

- DMEM = Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium,

Firma: Biochrom KG, Berlin, Deutschland

- FKS = Fetales Kälberserum,

Firma: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

- 4 %-ige Formalinlösung, pH 7,0; gepuffert

Firma: Formafix Global Technologies, Birmingham, Großbritannien

- Percoll,

Firma: Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

- 90 %-ige Percoll-Lösung in HBSS-Puffer (5,0 ml HBSS (1x) + 25 mmol Hepes
(0,2979 g) + 45,0 ml Percoll)

- Trypanblau (0,4 %-ig),

Firma: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

3.1.4 Chemikalien

- (+-)-Nikotin,
Firma: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Acetylsalicylsäure.
Firma: Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
- Triamcinolon,
Firma: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Trypsin,
Firma: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Desoxyribonuclease 1 extrahiert vom Schweinepankreas,
Firma: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

3.1.5 Assays und Geräte

- Assays
 - Cell Proliferation Kit 1 (MTT),
Firma: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
 - Cytotoxicity Detection Kit (LDH) ,
Firma: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
 - Vectastain Elite-ABC-Kit,
Firma: Vector Laboratories, Burlingame, USA
 - Hydrogen Peroxidase Assay Kit,
Firma: BioVision Research Products, Mountain View, USA
 - Elecsys 2010 sFlt -1 Assay,
Firma: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Technische Geräte
 - Brutschrank „Function Line“ mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre; 37 °C und 5 % CO₂,
Firma: Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
 - Blutzuckermessgerät „Biosen 5140“,

- Firma: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Drehvorrichtung „Jouan IG 150“,
Firma: Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland
 - Dreh- und Schwenkvorrichtung „Reax 2000“, Firma: Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
 - Gefrierschrank „ultra low“ für –86 °C,
Firma: Sanyo Biomedical, Wood Dale, USA
 - Gefrierschrank „Liebherr Premium“ für –20 °C,
Firma: Liebherr-International AG, Kirchdorf an der Iller, Deutschland
 - Microplate Reader „Madol 680“,
Firma: Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
 - Multipipette Eppendorf Research,
Firma: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
 - Mikroskop „Axiovert 40 C“,
Firma: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
 - Mikroskopkamera „Axiocam MRC“,
Firma: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
 - pH-Meter,
Firma: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
 - Pipetten. diverse,
Firma Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
 - Sicherheitswerkbank „Hera Safe“,
Firma: Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
 - Waage „Sartorius BP 2105“,
Firma: Data Weighing Systems, Inc., Elk Grove, USA
 - Zentrifuge „Biofuge Pico“,
Firma: Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
 - Zentrifuge: „Universal 320x“,
Firma: Hettich Holding GmbH und Co. oHG, Kirchzell, Deutschland
 - Zentrifuge „Rotanta / TR“,
Firma: Hettich Holding GmbH und Co. oHG, Kirchzell, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation der Trophoblastzellkulturen

Bei der im Folgenden beschriebenen Methode handelt es sich um die Trophoblastzellisolierung nach Kliman et al., welche von Jeschke et al. modifiziert wurde (Kliman H.J. 1986; Jeschke U. 1996; Jeschke U. 2002). Wie in Abbildung 11 zusammengefasst, basiert die Methode auf einer groben Präparation der plazentären Kotyledonen, anschließender enzymatische Verdauung und einer selektierenden Percoll-Gradienten-Zentrifugation.

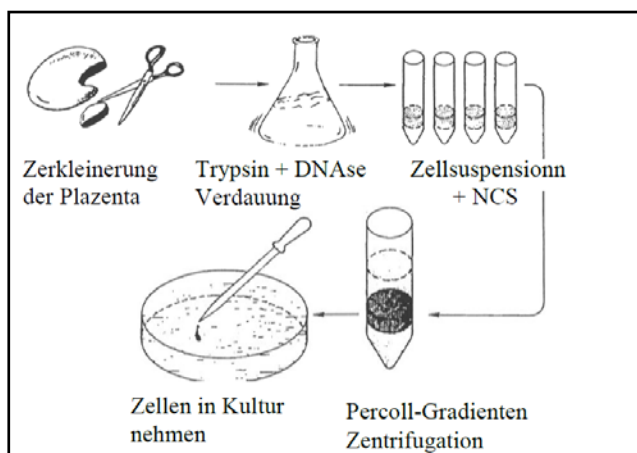


Abb. 11: Überblick über den Ablauf der Präparation von Trophoblastzellen aus Plazentamaterial modifiziert nach Kliman 1992

Als Ausgangsmaterial für die Präparation der Trophoblastzellkulturen dienten Plazenten des dritten Trimenons. Sofort nach der Ausstoßung der Plazenta wurden diese von Geburtshelfern auf Vollständigkeit und etwaige Abnormalitäten untersucht. Um Infektionen, Blutgerinnung und physiologische Zersetzung zu unterbinden, wurde die Plazenta daraufhin in physiologischer Kochsalzlösung, die mit Antibiotika und Antikoagulantia versetzt war, aufbewahrt. Nach dem Transport vom Kreißsaal in die Räume des Forschungslabores fanden sämtliche im Folgenden aufgeführte Präparation an der Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen statt.

Mit dem Präparierbesteck wurden zunächst einzelne Kotyledonen herausgelöst. Hierbei war es wichtig, die maternale Seite der Plazenta zum Präparator zeigend zu platzieren, um das Herauslösen der Kotyledonen zu vereinfachen. Um eine adäquate Trophoblastenzellzahl am Ende der Präparation zu erhalten war es nötig, mindestens das Plazentagewebe von 15 Kotyledonen zu nutzen.

Nachdem die einzelnen Kotelidonen in physiologischer Kochsalzlösung gereinigt wurden, konnte das Parenchym von den placentären Blutgefäßen getrennt werden. Nach entsprechender Trocknung auf Papiertüchern wurde das Gewebe unter Gebrauch einer Skalpell-Klinge in einer Petrischale von den Blutgefäßen getrennt. Sobald ca. 50 ml reines Parenchym isoliert werden konnten, konnte mit der enzymatischen Andauung des Gewebes begonnen werden.

Es war zunächst eine sterile 500 ml Flasche vorzubereiten in welche 142,55 mg Trypsin, 5,0 mg DNase und 112,6 ml HBSS-Hepes-Puffer gefüllt wurden. Nach Zugabe des Gewebematerials wurde dieser Ansatz unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5% CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) und unter Drehung für zehn Minuten inkubiert. Durch die ablaufende Trypsinierung war es möglich, verschiedene Zelltypen, vor allem aber die Trophoblastzellen, aus dem Gewebe zu lösen.

Nach der Inkubationszeit entstand ein Überstand in der Flasche, der sich aus dem beigefügten HBSS-Hepes-Puffer und den gelösten Zellen zusammensetzte. Im nächsten Arbeitsschritt wurde durch eine Pipette entsprechender Überstand entnommen und durch Gazefilter (40 µm Filtrationslochdurchmesser) filtriert, um eventuell anpipettierte Gewebereste zu entfernen. Es wurde so viel Überstand entnommen, wie möglich und die gewebstrestfreie Suspension in 50 ml Röhrchen überführt. Als Minimum befanden sich nach Ende dieses Arbeitsschrittes in jedem Röhrchen 35 ml Suspension. Es war ausgesprochen wichtig, zeitnah in diesen Suspensionen die Trypsinierung zu stoppen, um eventuellen Zellverlust zu verhindern. Hierzu wurde die erhaltene Suspension, unter Verwendung einer 5-ml-Spritze mit Punktionskanüle, mit NBCS unterschichtet. Das Verhältnis von NBCS zu filtrierter Suspension betrug jeweils 1:10. Die Zentrifugenröhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank (+4 C°) gelagert.

Die verbleibenden Gewebestücke in der sterilen 500-ml-Flasche wurden anschließend einer weiteren Trypsinverdauung unterzogen. Hierzu wurde 94,95 mg Trypsin in die Flasche mit dem verbleibenden Parenchymgewebe gegeben und in 75 ml HBSS-Hepes-Puffer gelöst. Dieser Ansatz wurde, ebenso wie der erste Ansatz, für zehn Minuten unter Drehung im Brutschrank inkubiert. Danach wurden in gleicher Arbeitsweise zwei weitere Zentrifugenröhrchen mit dem entstandenen Überstand gefüllt und die Verdauung durch NBCS gestoppt. Die gefüllten Röhrchen wurden ebenfalls gekühlt (+4 C°) gelagert.

Um möglichst viele Trophoblastzellen aus dem Gewebe gewinnen zu können, wurde der Verdauungsschritt noch ein drittes Mal durchgeführt. Bei diesem Schritt wurden 75,0 mg Trypsin mit 47,5 ml HBSS-Hepes-Puffer in der Flasche mit den restlichen Gewebestücken gelöst. Auch dieser Ansatz wurde für zehn Minuten unter Drehung im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Füllung der Zentrifugenröhrchen wie in den vorangegangenen Schritten. Die sich nun in der Flasche befindenden Gewebereste wurden verworfen.

Im nächsten Schritt wurden alle sechs Röhrchen zunächst für zehn Minuten bei 2500 U/min ohne Abbremsen sowie bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Im dadurch entstandenen Pellet, dem Sediment am Boden des Zentrifugationsröhrchens, befanden sich alle korpuskulären Bestandteile der Suspension.

Nach Abschluss der Zentrifugation wurden die entstandenen Überstände in allen sechs Röhrchen verworfen. Anschließend wurde jedes Röhrchen nacheinander mit 15 ml eiskühlem Aqua bidest. gefüllt und das nach der Zentrifugation entstandene Pellet mit Hilfe der Dreh- und Schwenkvorrichtung darin gelöst. Nachdem das Pellet vollständig im Aqua bidest. suspendiert wurde, konnte 7,5 ml 2,7 %-ige Kochsalzlösung hinzugegeben werden. Die 2,7 %-ige Kochsalzlösung normalisierte den natürlichen Elektrolytgehalt der Suspension und wirkte so zellprotektiv. Dieser Prozess wurde mit allen sechs Röhrchen durchgeführt. Anschließend wurden diese für fünf Minuten bei 1800 U/min und Zimmertemperatur mit aktivierter Bremse zentrifugiert. Dieser Vorgang diente zur Erythrozytenhämolyse. Diese war notwendig, da die Erythrozyten den größten Zellanteil an der in diesem Schritt vorliegenden Suspension bilden und so die Isolation der Trophoblastzellen erschweren. Die Farbe des Pellets stellte einen Indikator für die noch vorhandenen Erythrozyten im Pellet dar. Deshalb war es wichtig, diesen Arbeitsschritt so oft zu wiederholen bis das nach der Zentrifugation entstehende Pellet weißlich bis blass-rosa war.

Zeigten die Pellets eine adäquate Färbung, konnten diese während des nächsten Arbeitsschrittes im Kühlschrank (+4 C°) aufbewahrt werden. Zunächst musste nun eine Lösung, bestehend aus 6.0 mg DNase und 60 ml DMEM-HEPES-Puffer, angefertigt werden. Von dieser Lösung wurden anschließend 8,75 ml in das erste Zentrifugenröhrchen überführt und das darin vorhandene Pellet unter Hilfe der Dreh- und Schwenkvorrichtung aufgelöst. Die entstandene Suspension wurde in das zweite Röhrchen überführt. Darauf folgend wurden nochmal 8,75 ml der angefertigten Lösung

in das erste Zentrifugenröhrchen gegeben, das Röhrchen mit der Lösung gespült und der Inhalt dann in das zweite Röhrchen überführt. Der gleiche Vorgang wurde ebenfalls für die Röhrchen Nummer drei und vier sowie für die Röhrchen Nummer fünf und sechs wiederholt. Am Ende dieses Arbeitsschrittes lagen drei Zentrifugenröhrchen vor, die jeweils eine Suspension aus 17,5 ml DNase-DMEM-HEPES-Puffer-Lösung und dem Material von zwei Pellets enthielten. Diese Röhrchen wurden für zehn Minuten bei 1800 U/min und Zimmertemperatur ohne Bremse zentrifugiert.

Nach beendeter Zentrifugation wurden die Überstände in den Zentrifugenröhrchen dekantiert. Anschließend wurde ein Pellet mit 3 ml HBSS-HEPES-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde genutzt, um die zwei weiteren Pellets ebenfalls zu resuspendieren. Abschließend wurden alle Zentrifugenröhrchen mit 1 ml HBSS-HEPES-Puffer gespült, so dass am Ende dieses Arbeitsschrittes noch ein Röhrchen mit ca. 4 ml Suspension vorlag. Diese Suspension war fast vollständig frei von Erythrozyten, enthielt aber neben den benötigten Trophoblastzellen noch weitere Zellarten (Leukozyten, Fibroblasten etc.). Um die Trophoblastzellen eindeutig von diesen Zellen zu trennen, wurde ein Dichtegradient genutzt. Für diese Methode war es zunächst wichtig, entsprechende Konzentrationen der Percoll-Lösung anzufertigen. Benötigt wurde Percoll in Konzentrationen von 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % und 70 %. Als Ausgangskonzentration für die Verdünnung wurde 90 %-iges Percoll verwendet, das durch Mischen von 45 ml Percoll und 5 ml HBSS-HEPES-Puffer entsteht. Ausgehend von dieser Lösung wurde der Gradient nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema angefertigt.

	Percoll 90 %-ig [ml]	HBSS-HEPES-Puffer [ml]
Percoll 20 %-ig	1,0	3,5
Percoll 30 %-ig	1,5	3,0
Percoll 40 %-ig	2,0	2,5
Percoll 50 %-ig	2,5	2,0
Percoll 60 %-ig	3,0	1,5
Percoll 70 %-ig	3,5	1,0

Tab. 1 Schema zur Anfertigung des Percoll-Gradienten.

In ein steriles 50-ml-Zentrifugenröhrchen wurden zunächst 4 ml der 20 %-igen Percoll-Lösung pipettiert. 4 ml der nächst höheren Konzentrationen wurden anschließend, mithilfe einer Punktionskanüle, unterschichtet. Nachdem die 70 %-ige Percoll-Lösung unterschichtet wurde, wurde die zu differenzierende Zellsuspension überschichtet. Das Röhrchen wurde dann für 20 Minuten bei 3000 U/min und Zimmertemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der Dichte der Trophoblastzellen setzten sich diese etwa auf Höhe der 40 bis 50 %-igen Percoll-Lösung ab. Schematisch ist dieses Verfahren in Abbildung 12 dargestellt. Nach Ende der Zentrifugation konnten die Trophoblastzellen, durch Abziehen der dritten und vierten Bande im Zentrifugenröhrchen die sich unmittelbar unter der zweiten, stark undurchsichtigen Bande befanden, isoliert werden.

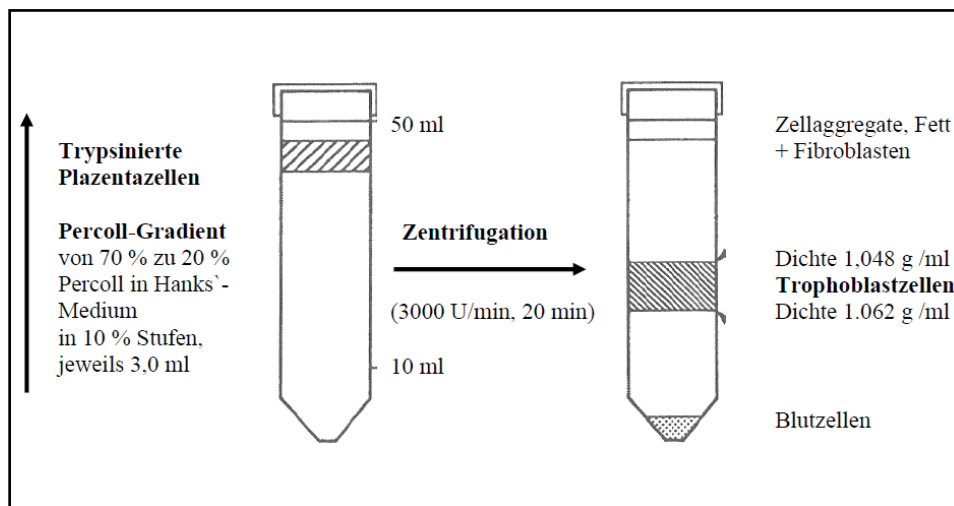


Abb. 12: Prinzip der Percoll Gradientenzentrifugation nach Contractor 1993

Zur Zählung der gewonnen Zellmenge wurden abschließend 20 µl der abgezogenen Zellsuspension mit 360 µl DMEM-HEPES-Puffer und 20 µl Trypanblau gemischt. 10 µl dieser Suspension wurden auf einer Bürkner-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop begutachtet und die Zellen zweimal auf 25 Quadrate ausgezählt. Aus dem gezählten Ergebnis lässt sich die Zellzahl pro ml Suspension unter Gebrauch nachfolgender Formel errechnen:

$$(1. \text{Zellzahl} + 2. \text{Zellzahl}) \times 10 (= \text{Verdünnung}) \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml Suspension}$$

Die Zellen wurden dann in das Nährmedium (DMEM + fetales Kälberseerum (anteilig 10%) + Penicillin/Streptomycin (anteilig 1,0 %) und Amphotericin B (anteilig 0,5 %)) überführt, auf 12er Well-Platten pipettiert und mit den entsprechenden Testsubstanzen versehen.

3.2.2 Applikation der zu testenden Substanzen und Zellkultivierung

Die Trophoblastzellen verhielten sich im Nährmedium und bei Inkubation unter physiologischen Bedingungen sehr ähnlich dem *in vivo*-Zustand. Zunächst liegen die Zellen einzeln vor. Nach 48 h bis 72 h bilden diese, entsprechend der Synzytiumbildung bei der Plazentation, mehrkernige Zellaggregate mit Zellmembran aus, die unter anderem sowohl die plazentären Hormone Östradiol und Progesteron als auch den Präeklampsiemarker sFlt-1 synthetisieren (Lüllmann-Rauch 2006; Vitoratos 2012). Schematisch dargestellt wird dieser Prozess in Abbildung 13.

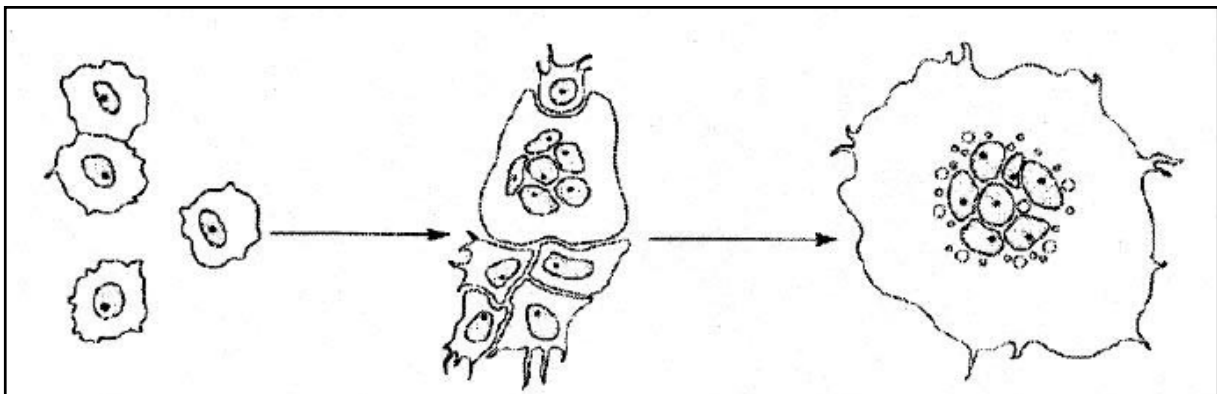


Abb. 13 Entwicklung von Synzytiotrophoblastzellen modifiziert nach Kliman 1986.

Appliziert wurden Nikotin, Acetylsalicylsäure und Triamcinolon. Als minimale Trophoblastzellkonzentration wurde 2 Millionen/ml festgelegt und die Suspension auf 12er – Well-Platten mit je 2 ml pro Well pipettiert. Pro Ansatz existierte ein well in dem sich nur Suspension (Nährmedium und Zellen) als Vergleichswert befanden. Des Weiteren wurden jeweils 10 µl verdünnter Testsubstanzen Nikotin, ASS und Triamcinolon appliziert. Die Konzentration der genutzten Substanzen ist Tab. 2 zu entnehmen.

Substanz	Konzentrationen
Nikotin	3 mol/l und 3×10^{-3} mol/l
ASS	$8,3 \times 10^{-5}$ mol/l und $8,3 \times 10^{-8}$ mol/l
Triamcinolon	0,06 mol/l und $7,5 \times 10^{-5}$ mol/l

Tab. 2 Konzentrationen pro Zellkultur der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen.

Für Nikotin wurde bei jedem Versuch mit der höheren Konzentration gearbeitet. Zusätzlich wurde jedoch bei einer Trophoblastenzellkultur eine verringerte Konzentration appliziert. Die Nikotinkonzentration ist an die Konzentration von Nikotin im Blut eines starken Rauchers angelehnt, die im Bevölkerungsdurchschnitt etwa 3×10^{-5} mol/l Blut beträgt (Romani 2011). Sie wurde jedoch für diese *in vitro* Studie modifiziert. Vergleichbare Konzentrationen finden sich ebenfalls in Studien anderer Arbeitsgruppen (Kwon 2010). Die Konzentration von ASS lehnte sich an frühere Versuche an. (Knight 2000). Die verwendeten Konzentrationen von Triamcinolon lehnten sich an eine Studie von Mandl et al. an, bei der kommerziell erworbene Chorioncarcinomzelllinien (BeWo, JEG3 und JAR) als Modell für humane Trophoblastzellkulturen dienten (Mandl 2006). Für die Verwendung in diesen Versuchen wurden zunächst sieben Konzentrationen in einem Trophoblastzellversuch getestet und die zweithöchste (0,05 mol/l) und die zweitniedrigste ($7,5 \times 10^{-5}$ mol/l) als Referenzkonzentrationen mit dem wahrscheinlich höchsten Erkenntniswert identifiziert.

3.2.3 Mikroskopische Methoden, pH-Wert-Messung und Präparation der Zellkulturen für weitere Untersuchungen

Im Laufe des Versuches wurden die Kulturen in regelmäßigen Abständen mikroskopisch untersucht. Vor der ersten 24-stündigen Inkubation erfolgte eine Untersuchung auf etwaige grobe Verunreinigungen oder das vermehrte Vorkommen von Blutzellen in der Kultur. Diese Überprüfungen fanden nach 24, 48 und 72 h erneut statt und wurden fotografisch dokumentiert. Anhand dieser Fotografien entstand gleichzeitig ein Entwicklungsprotokoll der Trophoblastzellen.

Nach Begutachtung und Fotografie, fand die Messung des pH-Wertes in den einzelnen Wells der Well-Platte statt. Das dazu genutzte pH-Meter ist unter dem Punkt 3.1.6 aufgeführt.

Als nächster Schritt erfolgte die Präparation der zellfreien Überstände für die spätere Bestimmung der Hormon- und sFlt-1-Konzentrationen. Die komplette Suspension wurde dazu aus den Wells abpipettiert und in ein 2-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 U/min konnten die entstandenen Überstände in ein neues Eppendorff-Röhrchen dekantiert werden. Es erfolgte eine adäquate Beschriftung der Eppendorff- Röhrchen, eine luftdichte Versiegelung mit Parafilm und eine abschließende Verwahrung bis zur weiteren

Verwendung im Gefrierschrank (-85 °C). Die Bestimmung der Konzentrationen von Progesteron und Östradiol wurde von einem externen Labor, der Cell Culture Technology GmbH in 19061 Schwerin, durchgeführt. Die Bestimmung der sFlt-1-Level wurde im Versuchslabor durchgeführt und ist unter Abschnitt 3.2.8 beschrieben.

3.2.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Bestimmung der Trophoblastzellen beruhte auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion unter Verwendung des monoklonalen Mausantikörper Zytokeratin 7 (Daya 1995). Verwendet wurde das Vectastain Elite ABC-Kit der Firma Vector Laboratories. Es wurde mit zwei für 72 h inkubierten Zellsuspensionen gearbeitet. Zunächst wurde die komplette Wellplatte mit der Zellsuspension zentrifugiert und die Überstände pipettiert. Die im Pellet verbleibenden Zellen wurden mit 1 ml 4 %-iger Formalinlösung pro Well versehen und waren so nach 30-minütiger Einwirkphase am Boden der Kulturplatte fixiert. Das Formafix wurde anschließend pipettiert und die Kulturplatte zweimal mit PBS-Lösung gespült. Nachdem diese von den Wells entfernt wurde, wurde verdünntes Pferdeserum auf die Zellen gegeben, anschließend musste es 30 Minuten einwirken. Das verdünnte Pferdeserum mussten vor der Durchführung des Testes angesetzt werden und entstanden durch das Mischen von 150 µl reinem Serum mit 10 ml PBS-Pufferlösung. Diese Lösung diente zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen und zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität. Anschließend wurde auch diese Blocklösung entfernt und die Kulturplatte mit PBS-Lösung zweimal gespült. Nun wurde einer der beiden Ansätze mit einer Lösung versetzt, die den Antikörper Zytokeratin 7 enthält und zuvor im Verhältnis 1:20 mit PBS-Puffer verdünnt wurde. Der zweite Ansatz bleibt als Kontrollwert antikörperfrei. Die Ansätze werden anschließend bei + 4 °C über Nacht stehen gelassen. Am folgenden Tag werden die Ansätze nach Entfernung der Antikörperlösung nochmals zweimal mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit dem Vectastain Elite ABC Reagenz versetzt. Dieses Reagenz besteht aus diversen Lösungen des Elite ABC Kit und muss so zeitnah wie möglich angefertigt werden. Bevor das Reagenz jedoch genutzt wird, muss es etwa 30 Minuten ruhig stehen. Nach Einwirken des Reagenz werden die Zellen wieder zweimal mit einer PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit Peroxidasesubstratlösung (0,3 %-ige H₂O₂-Lösung in Aqua. dest.) versetzt. Diese induziert eine Farbreaktion. Es tritt eine rötliche Färbung der

Trophoblastzellen ein. Wenn diese Färbung eine geeignete Intensität angenommen hat, kann die Peroxidasesubstratlösung durch destilliertes Wasser abgewaschen werden. Trophoblastzellen erscheinen nun rötlich bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop. Der Ansatz ohne Zugabe der Antikörperlösung sollte als Kontrolle keine Rotfärbung zeigen.

3.2.5 Bestimmung der extrazellulären Laktatdehydrogenase-Aktivität

Zur Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) Aktivität wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche verwendet. LDH ist ein Enzym des Zytoplasmas welches Laktat in Pyruvat umwandelt und bei einer Zellyse schnell in den Extrazellulärraum abgegeben wird (Decker 1988). Dort kann es effektiv bestimmt werden. Bei der Umwandlung von Laktat in Pyruvat entsteht aus NAD^+ die protonierte Form $\text{NADH} + \text{H}^+$. Der Katalyst des *Cytotoxicity Detection Kit* nutzt die beiden Protonen des $\text{NADH} + \text{H}^+$ und bindet diese an Tetrazoliumsalz, welches unprotoniert in blass-gelblicher Form vorliegt. Nach Protonierung ist dieses Salz rot und wird als Formazan-Salz bezeichnet. Zur Messung der LDH-Aktivität konnte somit die Extinktion dieses Salzes in Lösung gemessen werden. Die Produktion von Formazan-Salz, und somit die Aktivität von LDH, stehen in direkter Proportionalität zur Quantität toter Zellen (Abbildung 14).

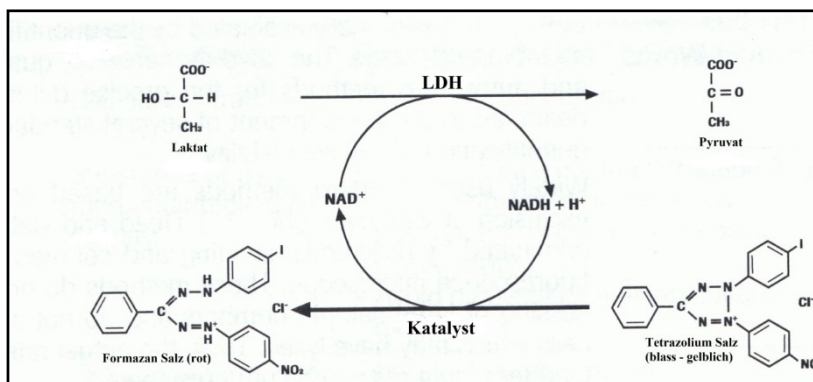


Abb. 14: Zusammenfassendes Schemata zum Prinzip des LDH – Zytotoxizitätstest modifiziert nach Roche Diagnostics GmbH 2011.

Bevor mit der Präparation der Proben begonnen werden kann, muss zunächst ein Kontrollwert, der nur Trophoblastzellen und Nährmedium enthält, mit einer Triton x-100-Lösung versehen werden. Diese Triton-Lösung induziert ein komplettes Zellsterben und wird in der Auswertung der Messergebnisse als Referenzwert verwendet. Aus den 2 ml Suspension werden 1,5 ml pipettiert und mit 20 μl Triton x-100-Lösung gemischt. Nach gutem Schütteln wird die Suspension zurück auf die Wellplatte gegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit werden jeweils 400 μl pro Probe (d.h. ein zusatzfreier Kontrollwert, ein Kontrollwert + Triton, ein

Ansatz mit reinem Medium und die jeweilige Anzahl von Testsuspensionen) in ein 2-ml-Eppendorf-Röhrchen pipettiert und diese für fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Die entstandenen Überstände werden in neue 2-ml-Eppendorf-Röhrchen dekantiert und anschließend werden aus jedem Röhrchen jeweils 3 x 100 µl auf eine 96er Wellplatte pipettiert, so dass im weiteren Verlauf eine dreifache Überprüfung der Messwerte möglich ist. Zusätzlich zu diesen 100 µl Überstand pro Well werden jeweils 100 µl Markerflüssigkeit hinzu gegeben. Diese Markerflüssigkeit entsteht aus einer Verdünnung der Katalyseflüssigkeit und der Färbelösung (Tetrazolium-Salz) im Verhältnis 1:46 und muss vor Beginn des Versuches angefertigt werden. Nachdem alle Ansätze mit Markerflüssigkeit versehen sind, wird die Wellplatte für 30 Minuten in völliger Dunkelheit und bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit läuft die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Reaktion ab, welche nach Ablauf der 30 Minuten mit Zugabe von 50 µl 0,2%-iger Salzsäure pro Well) gestoppt wird. Nun erfolgt die Messung der Extinktionen der jeweiligen Ansätze mit dem ELISA Reader bei einer Wellenlänge vom 492 nm zu einer Referenz von 620 nm. Die Zytotoxizität kann aus den gemessenen Extinktionen wie folgt berechnet werden:

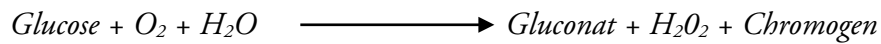
$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{Untersuchter Ansatz} - \text{Kontrollwert ohne Zusätze}}{\text{Kontrollwert mit Tritonzugabe} - \text{Kontrollwert ohne Zusätze}} \times 100$$

3.2.6 Bestimmung des Glucosemetabolismus

Glucose ist als Energieäquivalent im Nährmedium der Trophoblastzellen vorhanden. Diese nutzen die Glucose zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels. Die Bestimmung der noch nicht metabolisierten Glucose im Medium ermöglicht eine Einschätzung der metabolischen Aktivität der Zellen. Zur Bestimmung der Glucose im Medium wurde ein Routineverfahren genutzt, das auch klinische Anwendung findet. Es handelt sich um ein enzymatisches Verfahren, was die quantitative Bestimmung der Glucose erlaubt.

Zunächst werden 250 µl der Zellsuspension entnommen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Diese Röhrchen werden fünf Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände in ein neues Röhrchen dekantiert. Von dem verbleibenden Überstand werden etwa 20 µl von einer Glaskapillare aufgenommen. Pro Ansatz werden zwei Glaskapillaren gefüllt, damit eine anschließende Doppelbestimmung möglich ist. Diese Glaskapillaren werden in

Eppendorf-Röhrchen gegeben, die mit einer Lösung gefüllt sind, die das Enzym 1. Glucoseoxidase (GOD) enthält. Anschließend werden diese Röhrchen offen für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. In diesen Röhrchen findet während dieser Zeit unter Katalysation der GOD folgende Reaktion statt:



Das entstandene Chromogen führt wiederum unter Applikation von Peroxidase zu Farbstoffbildung. Für die Bestimmung der Konzentrationen werden die Proben mit dem BIOSEN 5140 ausgelesen.

3.2.7 Vitalitätstest

Zur Testung der Zellvitalität wurde das Cell Proliferation Kit 1 (MTT) der Firma Roche verwendet. Dieser Test beruht, ähnlich wie das Assay zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen, auf dem Umsatz von Tetrazolium-Salz (MTT) zu Formazan-Salz, misst diesen Umsatz jedoch interzellulär. Die Reaktion, dargestellt in Abbildung 15, kann nur ablaufen, wenn durch den Zellmetabolismus genügend NADPH zur Verfügung steht. Somit ist die Produktion des rötlichen FormazanSalzes direkt proportional zur Vitalität der Zellen.

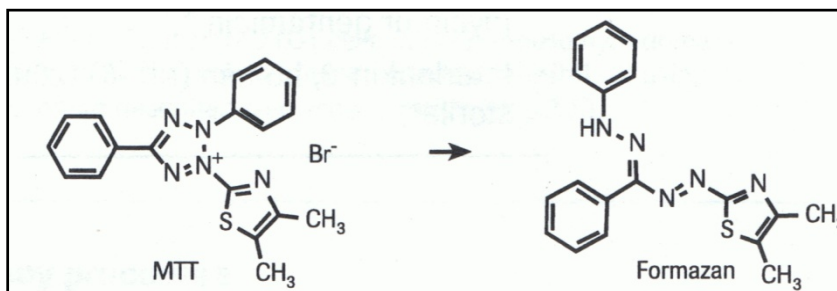


Abb. 15 : Schema der grundlegenden Reaktion die dem Cell Proliferation Kit 1 aus Roche Diagnostics GmbH 2005.

Der Test wurde durchgeführt, nachdem die Trophoblastzellen für 72 h in einer 96er Wellplatte inkubiert worden sind.

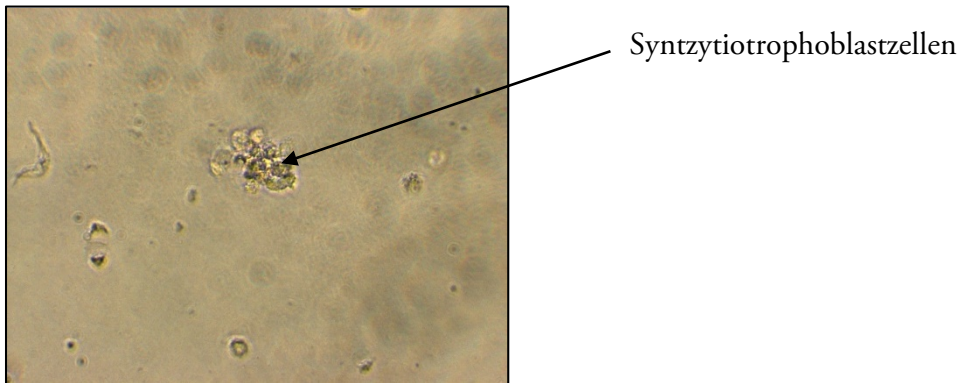


Abb 16 : Syntzytium von Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation, 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

Zunächst werden 10 µl der MTT-Lösung auf je 100 µl der inkubierten Zellsuspension gegeben. Dieses Gemisch wird anschließend für vier Stunden unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Während dieser Inkubationszeit formen sich je nach Zellmetabolismus blassrote Formazansalzkrystalle.

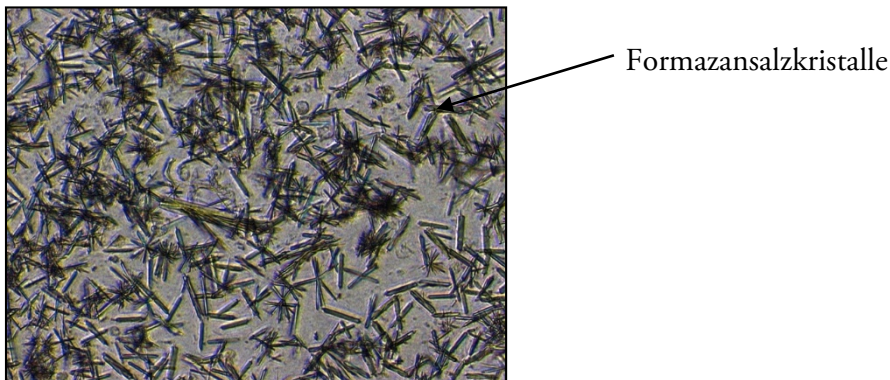


Abb. 17 Trophoblastzellen nach 4 Stunden Inkubation mit MTT – Lösung, 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

Diese Kristalle sind unlöslich in wässriger Lösung und daher für eine photometrische Messung unbrauchbar. Um die Kristalle aufzulösen wird eine spezielle Lösung (10% SDS in 0.01 M HCl)



Abb.18 Trophoblastzellkultur nach Auflösung von Formazansalzkrystallen, 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

in den Ansätzen angewandt. Nachdem alle Kulturen mit dieser Lösung versehen wurden, werden diese über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen sind alle Kristalle gelöst und es kann eine photometrische Messung mit dem Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm zu einer Referenz von 655 nm vorgenommen werden. Je höhere Extinktionen dabei gemessen werden können, desto mehr metabolisch aktive Zellen befinden sich in der Kultur.

3.2.8 Bestimmung der Konzentration der löslichen fms-ähnlichen Tyrosinkinase-1

Wie im Vorangegangenen beschrieben spielt die lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase-1 (sFlt-1) eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie und kann für eine mögliche Früherkennung der Krankheit genutzt werden. sFlt-1 wird vom Synzytiotrophoblasten synthetisiert und findet sich demnach auch in den verwendeten Zellsuspensionen. Eine Bestimmung der sFlt-1 Level in den Ansätzen kann somit zu einer Aussage über die Auswirkungen der getesteten Substanzen auf die Entwicklung der Präeklampsie genutzt werden.

Zur Bestimmung der sFlt-1 Konzentrationen wurde das Elecsys 2010 Gerät der Firma Roche verwendet. Die komplette Untersuchung wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Zunächst erfolgt die Abnahme und Zentrifugation (1500 U/min) von ca. 1 ml Zellsuspension, ähnlich der Vorbereitung zur Testung der Hormonspiegel. Nach der Zentrifugation und dem anschließenden Verwerfen der Präzipitate wird die Probe im Gerät platziert. Des Weiteren erfolgt die Platzierung der gebrauchsfertigen Lösungen *M*, *R1* und *R2* im Reagenzrotor des Gerätes. Diese Reagenzien stehen in Flaschen zur Verfügung, die selbsttätig im Gerät geöffnet und geschlossen werden. Vor der Beladung des Gerätes mit der Probe muss dieses jedoch mindestens alle 28 Tage und vor Gebrauch einer neuen Reagenzcharge auf diese kalibriert werden. Die Zusammensetzung der Reagenzien ist in Tabelle 3 zu entnehmen.

<i>M</i>	Streptavidin–beschichtete Mikropartikel (0,72 mg/ml), Konservierungsmittel
<i>R1</i>	Biotinylierter monoklonaler anti-sFlt -1 Mausantikörper (0,5 mg/L), Phosphatpuffer (100 mmol/L), Konservierungsmittel
<i>R2</i>	Monoklonaler anti sFlt-1 Mausantikörper markiert mit Ruthenium-Komplex (1,0 mg/L), Phosphatpuffer (100 mmol/L), Konservierungsmittel

Tab. 3 Bestandteile der Lösungen des Elecsys 2010 Kits zur Bestimmung der sFlt -1 Konzentrationen

Der Test läuft nach dem Sandwichprinzip ab. Zunächst bilden in einer ersten Inkubation die Antikörper aus *R1* und *R2* einen Sandwich-Komplex mit dem sFlt-1 das sich in der Probe (ca. 20 µl) befindet. Nach Zugabe von der mit Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird dieser Komplex über die Biotin-Streptavidin Wechselwirkung an der Festphase gebunden. Anschließend überführt das Gerät das Reaktionsgemisch in die Messzelle, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert werden. Die ungebundenen Substanzen werden dann mit einer ProCell-Lösung entfernt und es wird eine Spannung induziert, die eine Chemielumineszenzmission induziert. Diese kann mit dem im Gerät befindlichen Photomultiplier gemessen werden. Über eine gerätespezifische Kalibrationskurve, die aus einer 2-Punkt-Kalibration und einer reagenzspezifischen Masterkurve generiert wird, kann so aus der gemessenen Chemielumineszenzmission die Konzentration von sFlt-1 in der Probe ermittelt werden.

3.2.9 Statistische Analysen

Zur statistischen Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse wurde das Analyseprogramm Sigma Plot 10.0 genutzt. Die Auswertung erfolgte unter der Verwendung eines gruppenvergleichenden t-Testes. Hierbei galten Vergleiche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $\geq 0,05$ als nicht signifikant. Vergleiche mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant bzw. Vergleiche mit $p \leq 0,01$ als sehr signifikant und Vergleiche mit $p \leq 0,001$ als hochsignifikant definiert.

4 Ergebnisse

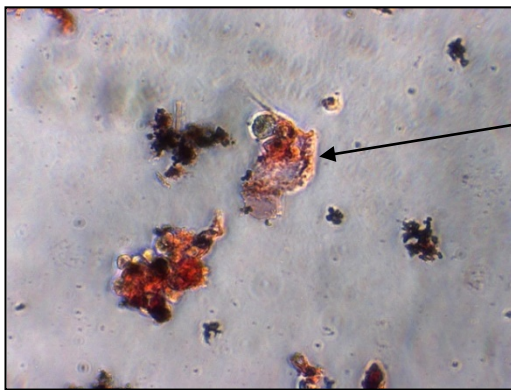
4.1 *Bestimmung und Entwicklung der Trophoblastzellen*

Zunächst war nachzuweisen, dass es sich bei den gewonnenen Zellen um Trophoblastzellen handelt. Hierzu wurde eine immunhistochemische Methode mit dem monoklonalen Mausantikörper Zytokeratin 7 genutzt. Die Ergebnisse der auswertenden Lichtmikroskopie sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt.



Synzytiotrophoblastzellen

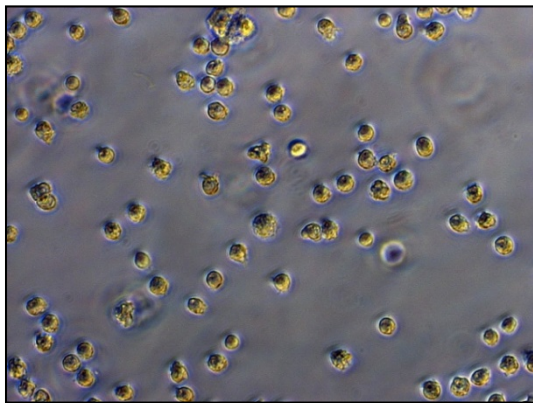
Abb. 19 Immunhistochemisch markierte Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation, 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012



Syntzytiotrophoblastzellen

Abb. 20 Immunhistochemisch markierte Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation, 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

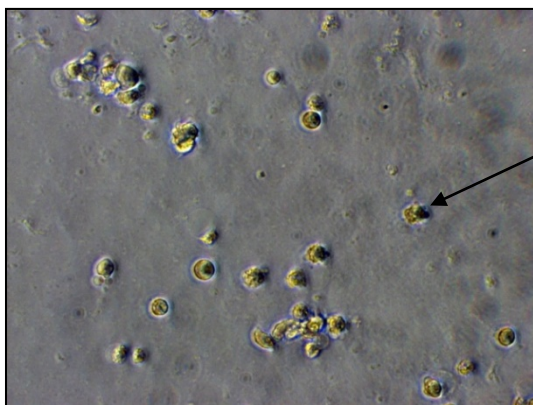
Durch diese Methode konnte eindeutig festgestellt werden, dass es sich bei den isolierten Zellen um Trophoblastzellen handelt. Die gewonnenen Trophoblastzellen wurden für 24, 48 und 72 h unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Es zeigten sich, je nach applizierter Substanz, unterschiedliche Entwicklungen. Der substanzfreie Ansatz wurde hierbei als Vergleichswert genutzt. Vor der Inkubation booten alle Ansätze ein ähnliches Bild, welches beispielhaft in Abbildung 21 zu erkennen ist.



Trophoblastzelle

Abb. 21 Trophoblastzellen vor ihrer Inkubation. 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

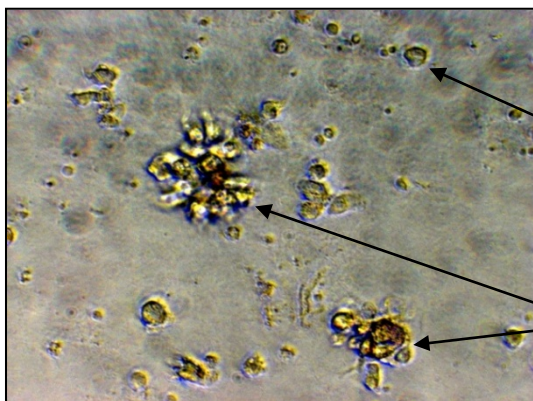
Bereits nach 24 h konnten erste Synzytien im Ansatz ohne Zusätze gefunden und fotografiert werden, siehe Abbildung 22.



Trophoblastzelle

Abb. 22 Trophoblastzellen nach 24 Stunden Inkubation in einer zusatzfreien Kultur, 32x Vergrößerung, Foto: F.Schumacher 2012

Nach weiteren 24 h Inkubation zeigten die Zellen gesteigerte Synzytiumbildung.



Trophoblastzelle

Synzytiotrophoblastzellen

Abb. 23 Trophoblastzellen nach 48 h Inkubation in einer zusatzfreien Kultur, 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

Abschließend wurden die Zellen nach 72 h Inkubation lichtmikroskopisch untersucht und fotografiert. Es konnten zahlreiche eindeutige Synzytiotrophoblastbildungen gefunden werden.

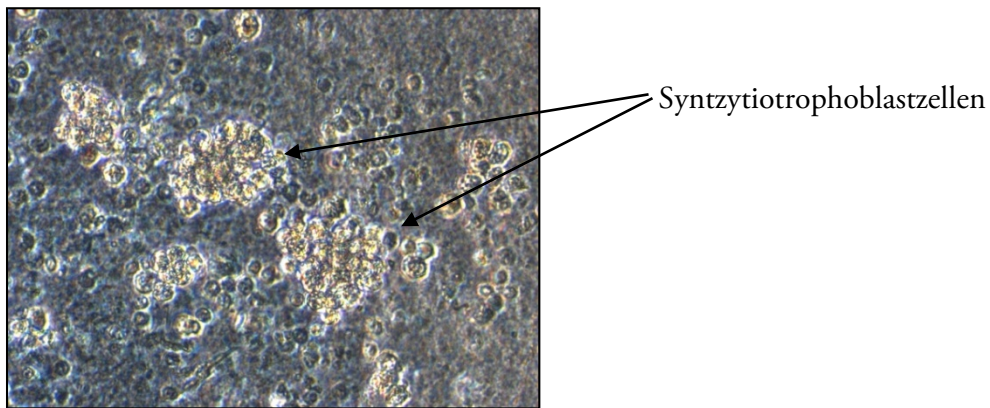


Abb. 24 Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation in einer zusatzfreien Kultur, 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

Die Entwicklung unter Gabe der getesteten Substanzen verlief sehr ähnlich zu den Vergleichswerten bei Triamcinolon- und ASS-Applikationen in geringer und höherer Dosierung. Ein Unterschied in der Synzytiotrophoblastbildung war lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Allerdings war eine verringerte Synzytiotrophoblastbildung unter Nikotingabe zu verzeichnen. Selbst nach 72 h Inkubation zeigten einige Ansätze definitiv erkennbare Synzytiumbildung.

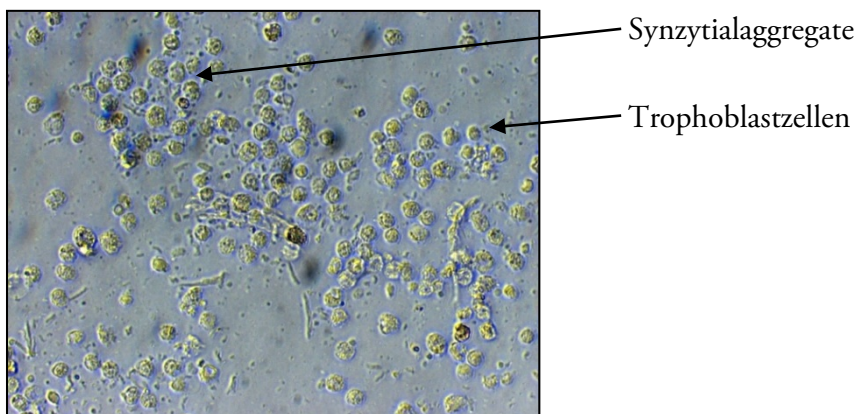


Abb. 25 Trophoblastzellkultur nach Nikotinapplikation und 72 h Inkubationszeit 32x Vergrößerung, Foto: F. Schumacher 2012

4.2 Expression von löslicher *fms*-ähnlicher Tyrosinkinase-1

sFlt-1 stand als wichtiger Marker des Präeklampsierisikos (Maynard 2003) im Fokus der Untersuchung. Es wurden sowohl sFlt-1 Expression in Trophoblastzellkulturen aus

Normschwangerschaften als auch aus Präeklampsieschwangerschaft im Verlauf nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit gemessen. Des Weiteren erfolgte eine Vergleichsanalyse der Konzentrationen des synthetisierten sFlt-1 nach 72 h Inkubation. Zur Bestimmung der Signifikanz der ermittelten Werte wurde ein t-Test durchgeführt.

In den Trophoblastzellkulturen, isoliert aus Plazenten der Normschwangerschaften, konnte eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Reduktion der sFlt-1-Spiegel unter Nikotinapplikation festgestellt werden. In sämtlichen Untersuchungen blieb die Produktion von sFlt-1 nahezu unverändert in den Ansätzen mit Nikotin. Nikotin wurde hier in der höheren Konzentration (3 mol/l) verwendet. Sowohl ASS und Triamcinolon zeigten bei den weiteren Versuchen keine signifikante Reduktion der sFlt-1 Level. Die Ansätze unter ASS-Gabe zeigten eine geringere sFlt-1 Produktion, allerdings lagen hier die Konzentrationen sehr nahe am Vergleichswert der Suspension ohne Zusätze. Auch entwickelte sich der Anstieg der sFlt-1 Konzentration bei ASS-Applikation nahezu proportional zu dem des Vergleichswertes. Triamcinolon wirkte sich ambivalent auf die sFlt-1-Produktion in den Ansätzen aus. Die Proben zeigten nach 24 h bereits eine Erhöhung der Spiegel und nach 48 h Inkubation steigerten sich diese Spiegel nochmals. Nach 72 h fiel der Wert jedoch wieder etwa auf das 24-h- Niveau, was zu diesem Zeitpunkt eine Verringerung unter die Level des Vergleichswertes bedeutete. Es wurde ebenfalls mit der höheren Konzentration von Triamcinolon gearbeitet. Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Abbildung 26 dargestellt.

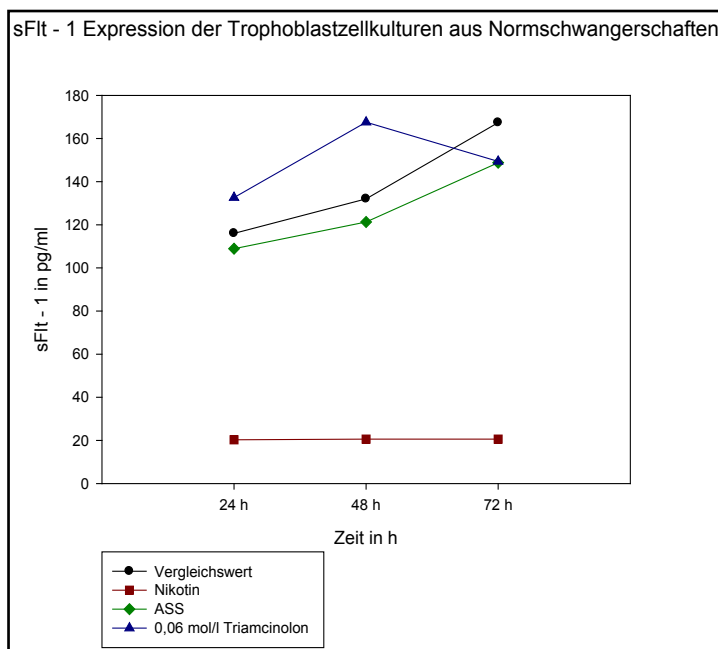


Abb. 26 Grafische Darstellung der Expression von sFlt-1 in den Kulturen aus Normschwangerschaftsplazenten (ASS = Acetylsalicylsäure)

Die Spiegel in den Trophoblastzellkulturen aus Präeklampsieschwangerschaft verhielten sich ähnlich zu denen aus Normschwangerschaften, jedoch verursachten alle getesteten Substanzen eine Verringerung der sFlt-1-Spiegel. Nikotinamplikation führte auch hier zu einem gleichbleibenden, niedrigen Niveau der sFlt-1-Konzentrationen, das sehr signifikant verringert war ($p < 0,003$). Es lag sogar im 72-h-Wert noch unter dem Wert der 24-h-Messung, fiel also im Verlauf der Untersuchungen ab. Es wurde ebenfalls mit Nikotin in der höheren Konzentration gearbeitet. ASS-Ansätze hielten sich im Verlauf der Tests wieder sehr nah am Vergleichswert und zeigten einen ähnlichen Anstieg wie dieser. Jedoch lagen die sFlt-1-Werte der ASS-Versuche immer unter denen des Vergleichswertes, verringerten diesen jedoch nicht signifikant. Triamcinolon-Gabe verursachte einen leichten Anstieg vom 24-h- zum 48-h-Wert, blieb aber unter den Werten von ASS-Ansätzen und Vergleichswert. Im 72-h-Wert zeigten die Triamcinolonproben einen sprunghaften Anstieg der zu ähnlichen Endwerten der ASS-Ansätze führte und ebenfalls keine signifikante Veränderung zum Vergleichswert aufwies. Abbildung 27 stellt die Ergebnisse zusammenfassend dar.

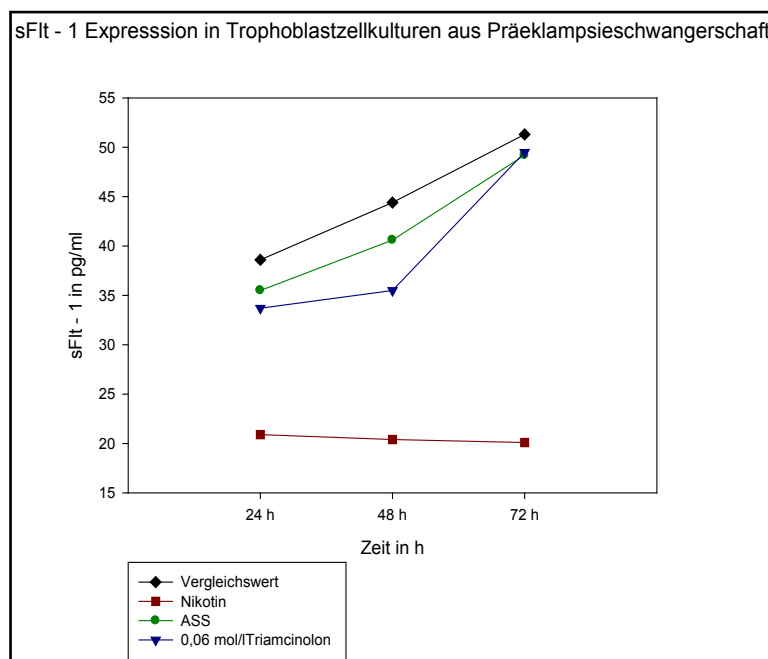


Abb. 27 Grafische Darstellung der Expression von sFlt-1 in den Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaftsmaterial (ASS = Acetylsalicylsäure)

Für die Grafik Nummer 28 wurden zwei Plazentakulturen ausgewertet und eine geringere Konzentration für Nikotin und ASS in die Versuche mit einbezogen. Es ist zu erkennen, dass alle Werte unter dem des Kontrollwertes liegen, jedoch zeigt die hohe Nikotinkonzentration die größte Verringerung gegenüber dem Kontrollwert in den sFlt-1-Werten. Die um das Zehnfache verringerte Nikotinkonzentration bewirkte ebenfalls eine Senkung der sFlt-1-Werte, blieb in der

Wirkung aber unter der Probe mit höherem Nikotingehalt. ASS, sowohl in hoher als auch in ebenfalls um das Zehnfache verringerter Konzentration, und Triamcinolon in 60- μ M-Konzentration, lagen in der sFlt-1 Konzentration nahe dem Kontrollwert.

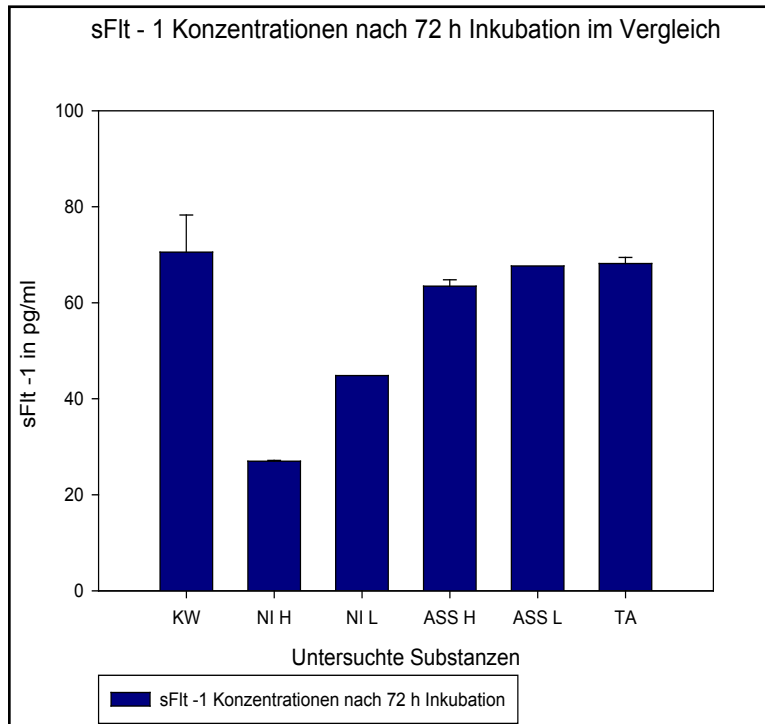


Abb. 28 sFlt-1-Konzentrationen nach 72 h Inkubation mit Standardabweichung. KW= Kontrollwert ohne Substanz, NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l

4.3 Hormonexpression der gebildeten Synzytien

Der Synzytiotrophoblast produziert *in vivo* diverse Hormone die für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft unerlässlich sind (Schumacher 1993). Zu diesen Hormonen zählen u.a. β -HCG, Progesteron und Östradiol (Lüllmann-Rauch 2006). Um eine gesicherte Aussage über die Funktion der *in vitro* gebildeten Synzytiotrophoblasten treffen zu können, wurden die Hormonexpressionen von Progesteron und Östradiol nach 24, 48 und 72 h Inkubationszeit im Verlauf gemessen. Die Werte basieren auf Kulturen aus fünf Normschwangerschaften und einer Präeklampsieschwangerschaft.

Nikotin, das hier in der Konzentration von 3 mol/l angewandt wurde, zeigte im t-Test eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Östradiolspiegel im Vergleich zum Ansatz ohne

Zusätze. Die Spiegel waren gleich bleibend niedrig und fielen zum 72-h-Wert hin ab. ASS, in der Konzentration von $8,3 \times 10^{-5}$ mol/l ampliziert, führte zunächst zu vermehrter Expression von Östradiol in den Synzytien. Diese fiel dann jedoch im weiteren Versuchsverlauf stark ab. ASS-Ansätze lagen jedoch zu jeder Zeit über der Östradiol Konzentration des Vergleichswertes. Triamcinolon wurde bei diesem Funktionstest in zwei Konzentrationen ampliziert. Die höhere Konzentration führte zu verringerten Spiegeln von Östradiol verglichen mit dem Ansatz ohne Zusätze. Diese näherten sich jedoch in der 72-h-Bestimmung den Konzentrationen des Vergleichswertes an. Triamcinolon in niedriger Konzentration verursachte stark erhöhte Östradiolspiegel nach 48 h Inkubation und ließ die Spiegel kontinuierlich über die des Vergleichswertes steigen. Die gemittelten Werte aus den insgesamt 5 Versuchsabläufen ist Tabelle 4 zu entnehmen. Abbildung 29 gibt einen Überblick über die Entwicklung der Östradiol-Konzentrationen in den einzelnen Trophoblastzellkulturen im Verlauf der Versuche.

	KW [pg/ml]	NIH [pg/ml]	ASS H [pg/ml]	TAH [pg/ml]	TA L [pg/ml]
24 h	618,06	350,98	949,65	436,43	651,85
48 h	678,10	353,37	836,35	562,00	831,55
72 h	633,20	302,03	678,20	617,37	741,45

Tab. 4 gemittelte Östradiol-Konzentrationen in den Kulturen aus Normschwangerschaftsplazenten

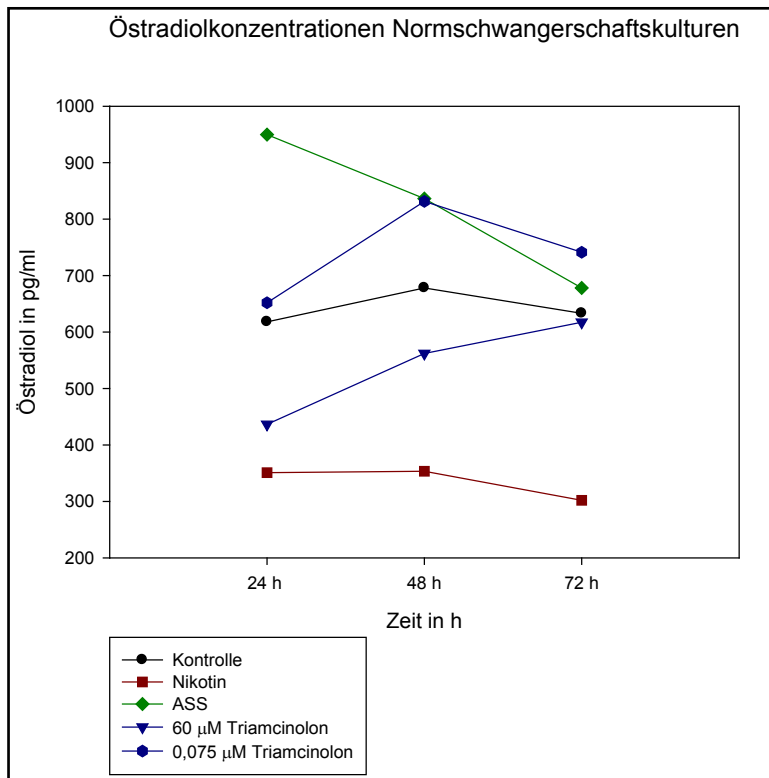


Abb. 29 Grafische Darstellung der gemittelten Östradiolkonzentrationen in Kulturen aus Normschwangerschaften im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)

Die Östradiol-Spiegel in den Kulturen, isoliert aus Plazentamaterial von einer Präeklampsieschwangerschaft, wiesen ähnliche Charakteristika auf wie die Kulturen, die aus Normschwangerschaften stammten. Generell lag die Östrogenproduktion jedoch in allen Versuchen unter vergleichbaren Werten aus Normschwangerschaftskulturen.

Nikotingabe suppressierte die Östradiolproduktion am stärksten von den drei getesteten Substanzen. Die Level waren hier gleich bleibend gering und zeigten kaum eine Veränderung im zeitlichen Verlauf der Versuche. ASS-Applikation bewirkte, im Gegensatz zum Nikotin, die höchsten Östradiol-Spiegel in den Versuchen. Bereits nach 24 h Inkubation lag der Östradiol-Spiegel in den Ansätzen zu denen ASS gegeben wurde am höchsten und stieg im weiteren Verlauf der Versuche auf Werte, die zwei- bis vierfach so hoch waren, wie die von Triamcinolon und Nikotin. Triamcinolon bewirkte in den Ansätzen eine durchschnittliche Östradiolexpression, die unter den ASS-Ansätzen aber deutlich über den Nikotin-Ansätzen lag. Eine leichte Erhöhung konnte nach 48 h festgestellt werden. Es wurde Triamcinolon in der hohen Dosis genutzt. Tabelle 5 gibt die Durchschnittswerte der Versuche an und Abbildung 30 beschreibt die Entwicklung der Konzentrationen im Verlauf der Versuche.

	NI H [pg/ml]	ASS H [pg/ml]	TA H [pg/ml]
24 h	147,9000	361,9000	268,7000
48 h	147,3000	485,2000	335,9000
72 h	144,8000	579,4000	314,9000

Tab. 5 gemittelte Östradiol-Konzentrationen der Kultur aus Präeklampsieschwangerschaft

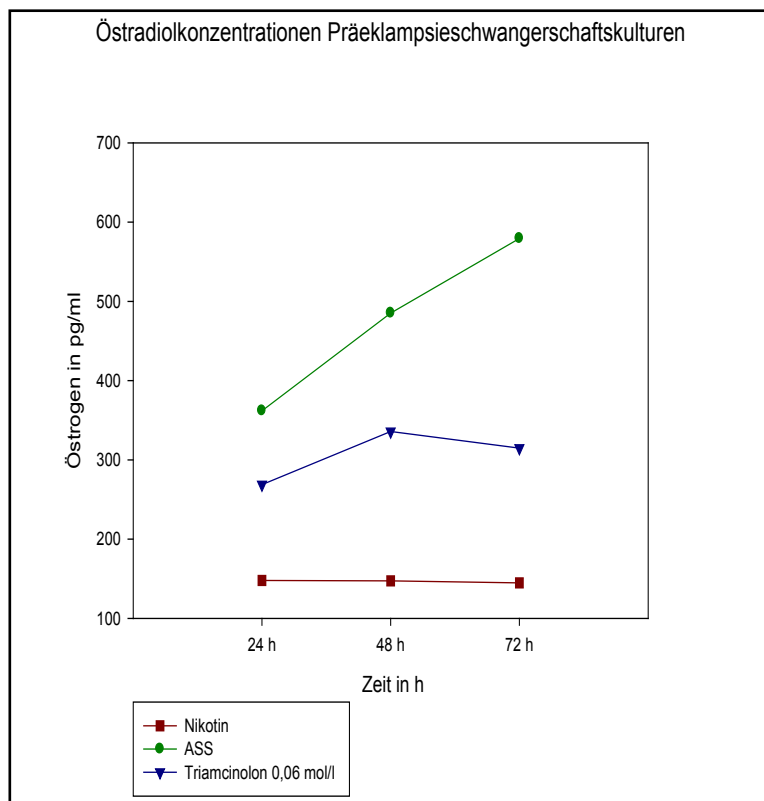


Abb. 30 Grafische Darstellung der gemittelten Östradiolkonzentrationen in Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)

Zusätzlich zu Untersuchungen bezüglich der Östradiolproduktion wurden Tests zur Bestimmung von Progesteron in den Zellsuspensionen durchgeführt. Dies geschah ebenfalls in Kulturen isoliert aus Plazentamaterial von Normschwangerschaften und in Kulturen isoliert aus Plazentamaterial von einer Präeklampsieschwangerschaft.

Zunächst sollen die Kulturen basierend auf Normschwangerschaften betrachtet werden. Hier kam es zu einem Abfall aller untersuchten Ansätze im ermittelten Wert nach 72 h Inkubation. Jedoch zeigten die einzelnen applizierten Substanzen Auffälligkeiten. Nikotin führte, ähnlich der Östradiolbestimmungen, zu einer sehr signifikanten ($p < 0,003$) Reduzierung der Progesteron-Spiegel in den Kulturen. Die Gabe von ASS induzierte eine vermehrte Progesteron-Produktion dem Vergleichswert gegenüber. Diese war sogar hochsignifikant erhöht ($p < 0,001$) Unter ASS fiel

die Progesteron-Produktion jedoch auch am stärksten zum 72-h-Wert hin ab. Triamcinolon, bei diesem Test sowohl in hoher als auch in niedriger Konzentration verwendet, hatte eine negative Wirkung auf die Progesteron-Konzentration im Vergleich zu den Ansätzen ohne Zusätze. Beide Konzentrationen von Triamcinolon führten zu einer Verringerung der Progesteron-Spiegel, jedoch verursachte die hohe Konzentration von Triamcinolon eine sehr signifikante Verringerung ($p < 0,009$) der Progesteron-Spiegel, während die niedrige Konzentration diese nicht signifikant verringerte. Tabelle 6 fasst die gemittelten Werte zusammen, während Abbildung 31 eine Übersicht über die Entwicklung der Progesteron-Konzentrationen im Verlauf des Versuches gibt.

	KW [ng/ml]	NI H [ng/ml]	ASS H [ng/ml]	TA H [ng/ml]	TA L [ng/ml]
24 h	4,0620	0,9000	8,0000	1,6600	2,0600
48 h	4,1120	1,3933	7,4350	1,9750	2,7833
72 h	2,9240	1,0000	5,5950	1,6250	2,3233

Tab. 6 gemittelte Progesteron-Konzentrationen der Kultur aus Normschwangerschaftsplazenten

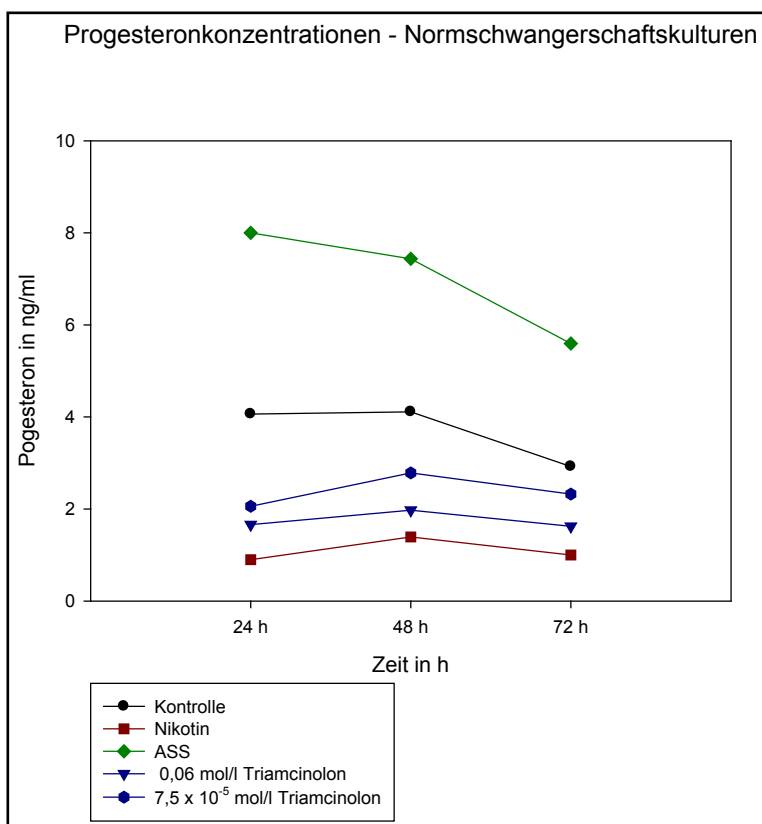


Abb. 31 Grafische Darstellung der gemittelten Progesteronkonzentrationen in Kulturen aus Normschwangerschaften im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)

Nach der Ermittlung der Progesteron-Konzentrationen in den Trophoblastzellkulturen aus Präeklampsieschwangerschaft bot sich ein anderes Bild als in Hormontesten davor. Nikotin sorgte hier für keine Verringerung der Progesteron-Produktion. Die Werte der Nikotinansätze lagen in etwa gleich mit denen der Triamcinolonansätze auf hohem Niveau. ASS hingegen induzierte die bei Weitem geringste Progesteron-Produktion. Die Werte der ASS-Ansätze stagnierten sogar im Vergleich vom 24-h-Wert und 48-h-Stunden Wert. Triamcinolon verursachte die höchste Progesteron-Produktion in den Suspensionen. Diese lag aber nur sehr knapp über der Produktion der Nikotin-Ansätze. Tabelle 7 zeigt die genauen gemittelten Werte. Abbildung 32 skizziert die Entwicklung der Progesteron-Produktion im Verlauf des Versuches.

	NI H [ng/ml]	ASS H [ng/ml]	TA H [ng/ml]
24 h	0,4500	0,0300	0,4500
48 h	0,4800	0,0300	0,5100
72 h	0,5000	0,1800	0,5200

Tab. 7 gemittelte Progesteron-Konzentrationen der Kultur aus Präeklampsieschwangerschaftsmaterial

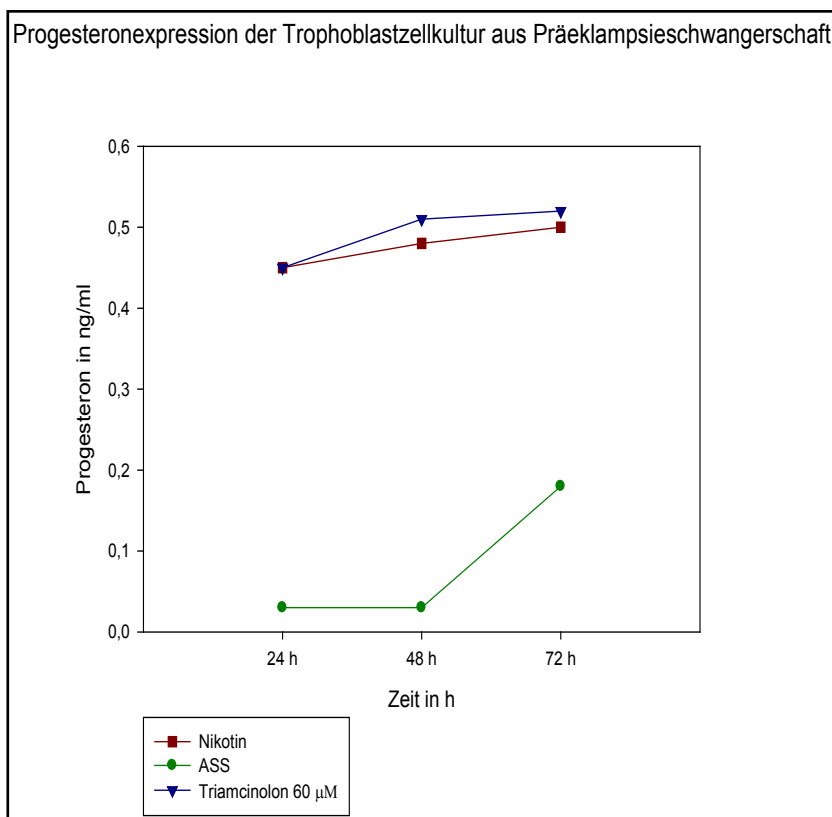


Abb. 32 Grafische Darstellung der gemittelten Progesteron-Konzentrationen in Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)

4.4 Untersuchungen zum Zellmetabolismus, pH-Wert, Glucosekonzentration und Vitalitätstest

Die pH-Werte wurden während des kompletten Versuches jeweils nach 24, 48 und 72 h direkt in der Suspension gemessen. Der Verlauf der pH-Wertentwicklung in Suspensionen mit Trophoblastzellen aus Normschwangerschaften ist dabei in Abbildung 32 dargestellt.

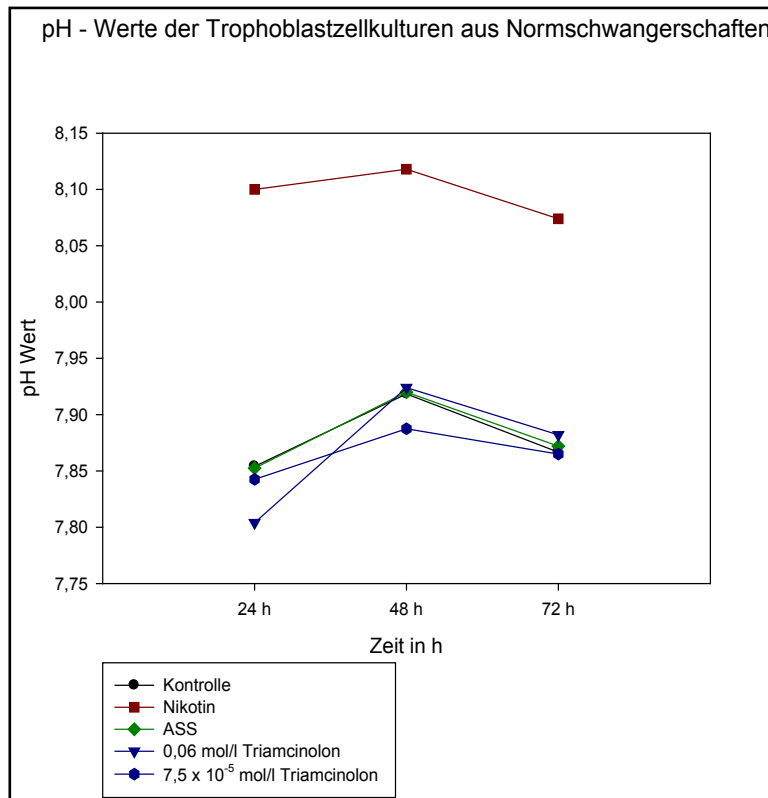


Abb. 32 Grafische Darstellung der Entwicklung von pH-Werten im Nährmedium während der 72-stündigen Inkubation in Kulturen aus Normschwangerschaften (ASS = Acetylsalicylsäure)

Die Grafik lässt deutlich erkennen, dass die Applikation von Nikotin zu einem deutlich erhöhtem pH-Wert über den gesamten Verlauf des Versuches führt. Die Erhöhung war hochsignifikant ($p < 0,001$). Bei diesen Messungen wurde Nikotin in der erhöhten Konzentration von 3 mol/l genutzt. Die Ansätze die ASS, ebenfalls in hoher Konzentration, und Triamcinolon, getestet in hoher und niedriger Konzentration, enthielten, lagen mit ihren pH-Werten nahe dem Vergleichswert des Mediums und zeigten keine signifikanten Änderungen.

Außer den pH-Werten der Normschwangerschaften wurden die pH-Werte des Versuches mit der Plazenta aus Präeklampsieschwangerschaft untersucht und sind in Abbildung 34 grafisch dargestellt. Auch hier zeigte Nikotin eine Erhöhung des pH-Wertes im Gegensatz zu den Ansätzen

mit ASS und Triamcinolon. Diese lagen, wie auch in den Versuchen mit Plazenten aus Normschwangerschaften, nahe den Werten des Kontrollansatzes ohne Zusätze. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass Nikotin in hoher Konzentration die pH-Werte aller Zellsuspensionen erhöht, während ASS und Triamcinolon keine signifikanten Auffälligkeiten bezüglich des pH-Wertes zeigen.

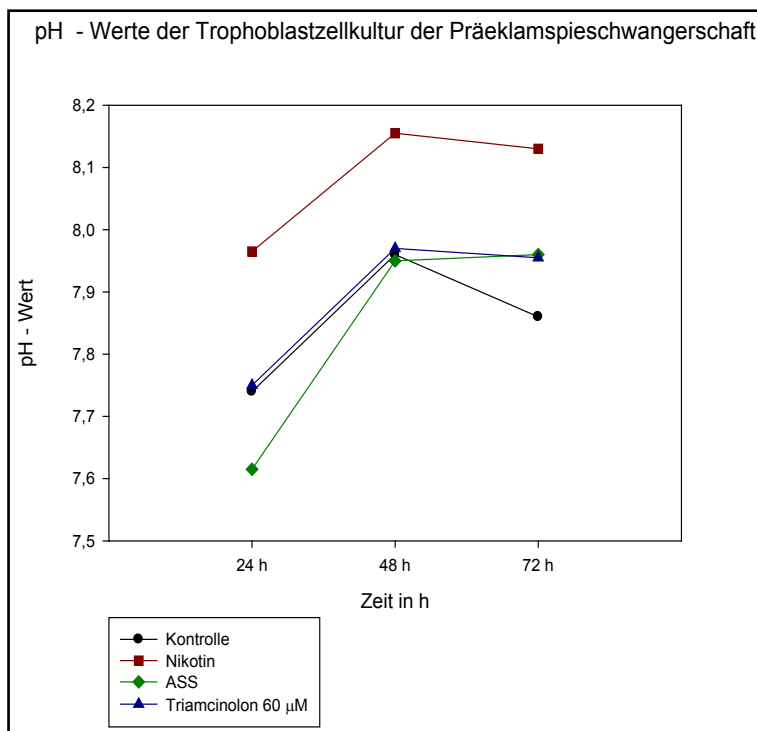


Abb. 34 Grafische Darstellung der Entwicklung von pH-Werten im Nährmedium während der 72-stündigen Inkubation in Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft (ASS = Acetylsalicylsäure)

Ein weiterer Parameter zur Bestimmung der Zellaktivität ist die Glucosekonzentration. Je mehr Glucose aus dem Nährmedium verstoffwechselt wurde, desto größer ist die zelluläre Aktivität. Abbildung 35 zeigt die Glucosespiegel der getesteten Substanzen nach 72 h Inkubation.

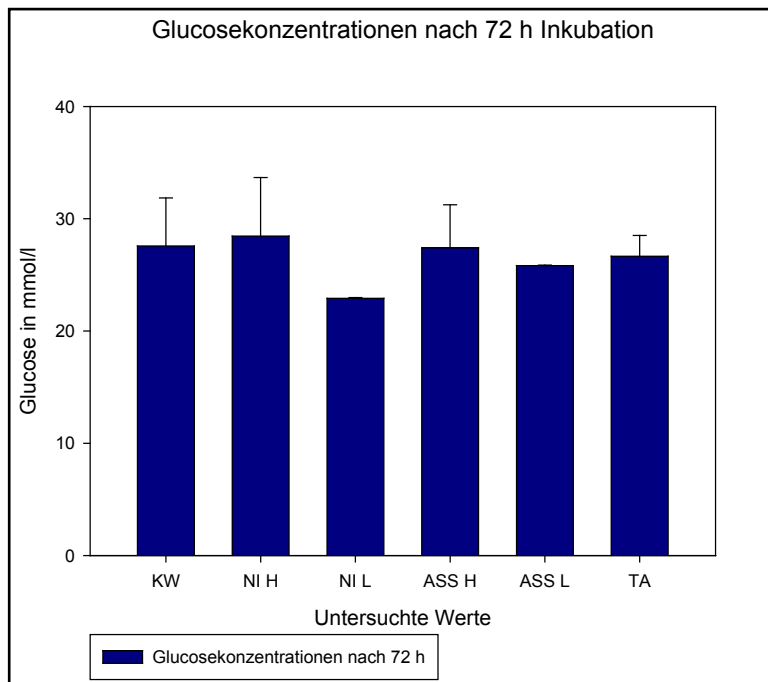


Abb. 35 Glucosekonzentrationen der getesteten Substanzen nach 72 h Inkubation in Kulturen aus Normschwangerschaften mit Standardabweichung, KW = Kontrollwert ohne Zusätze, NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l

Zur Testung der Zellvitalität wurde der in Punkt 3.2.8 beschriebene Test auf Grundlage der Tetrazolium-Salz-Reaktion genutzt. Abbildung 36 gibt die prozentuale Vitalität in Beziehung zum Vergleichswert ohne Zusätze an.

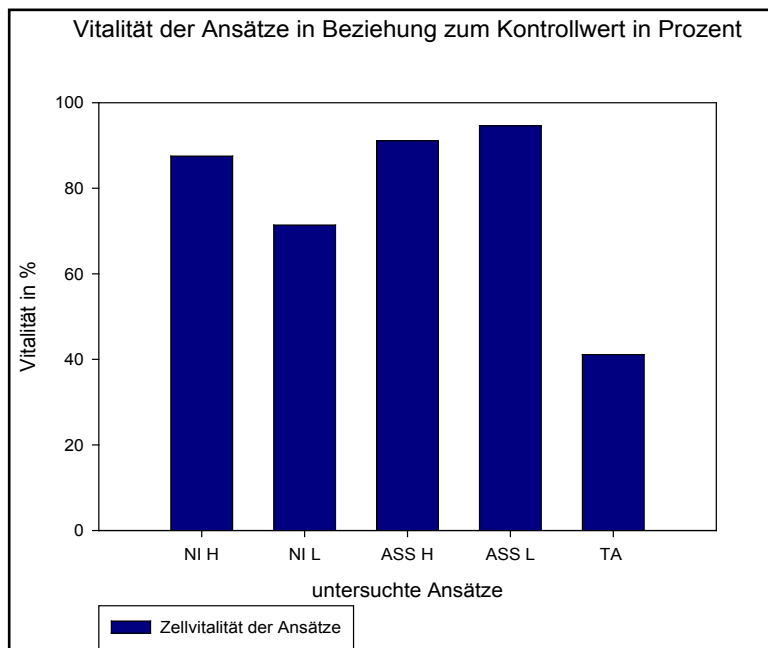


Abb. 36 Errechnete Vitalität der Kulturen aus Normschwangerschaften in Beziehung zum Vergleichswert (= 100 %), NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l

Die Anreicherung der Zellsuspensionen mit Nikotin in höherer Konzentration führt zu einer Vitalität von 87,5 % des Vergleichswertes. Dies ist der dritthöchste Wert, ist nicht signifikant verringert und liegt nur hinter den Ansätzen mit ASS-Zugabe. Nikotin in geringerer Konzentration hingegen verursacht einen Abfall auf 71,4 % und verringert so die Vitalität der Zellen stärker. ASS führt in beiden Konzentrationen zu hohen Vitalitätswerten von 91,1 % (ASS $8,3 \times 10^{-5}$ mol/l) und 94,6 % (ASS $8,3 \times 10^{-8}$ mol/l). Triamcinolon-Applikation schnitt bei diesem Vitalitätstest am schlechtesten ab und zeigte mit nur 41,4 % die bei Weitem niedrigsten Werte. Keine der getesteten Substanzen konnte jedoch die Vitalität des Ansatzes ohne Zusätze erreichen oder gar übertreffen.

4.5 Zytotoxizität der getesteten Substanzen

Die Zytotoxizität wurde über eine Bestimmung der LDH-Aktivität, wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben, ermittelt. Die Bestimmung erfolgte an zwei Versuchsreihen die aus Plazenten aus Normschwangerschaften isoliert wurden. Abbildung 37 gibt eine Übersicht über die ermittelte Zytotoxizität im Vergleich zum Kontrollwert.

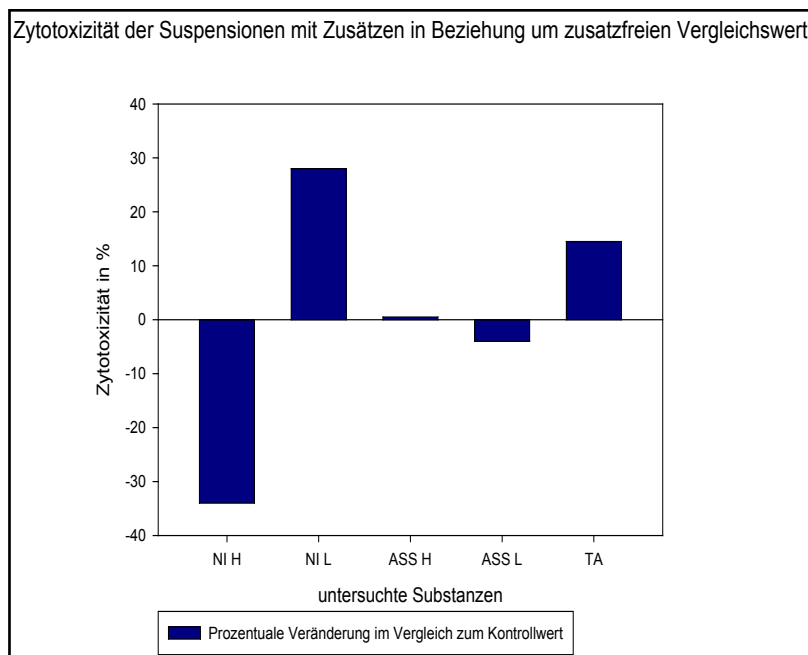


Abb. 37 Durchschnittliche Zytotoxizität der getesteten Substanzen in Kulturen aus Normschwangerschaften in Beziehung zum Vergleichswert (= 100%), NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l

Bei Nikotin in hoher Konzentration lässt sich hier eine klare Verringerung der Zytotoxizität erkennen, die im Median um ca. 34 % unter der des Vergleichswertes ohne Zusätze liegt. Nikotin das in verdünnter Form appliziert wurde zeigt hingegen eine deutliche höhere Zytotoxizität als der Vergleichswert. Bei ASS hingegen scheint die Konzentration nur geringen Einfluss auf die im allgemeinen geringe Zytotoxizität zu besitzen. Die Werte beider Ansätze lagen nahe dem Ansatz ohne Zusätze. Triamcinolon zeigt eine erhöhte Zytotoxizität, die jedoch noch immer unter der des niedrig dosierten Nikotins liegt.

5 Diskussion

Ein maternaler Hypertonus (BP \geq 140/90 mmHg) manifestiert sich in ca. 10 % aller Schwangerschaften (Robillard 2011). Besteht dieser Hypertonus auch noch nach der 20. Gestationswoche und geht mit einer Proteinurie einher, kann von Präeklampsie gesprochen werden (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2013). Präeklampsie betrifft ca. 3-5 % aller Schwangeren weltweit (Walker 2000) und stellt eine schwerwiegende Komplikation im Verlauf der Schwangerschaft dar, die sowohl Patientinnen als auch medizinisches Personal vor große Herausforderungen stellt (Young 2010). Unter anderem können maternale und perinatale Mortalität, Frühgeburten (Entbindung vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche) und intrauterine Wachstumsstörungen die Folge sein (Sibai 2005). Trotz Fortschritten in der Präeklampsieforschung der letzten 25 Jahre, sind die genaue Pathogenese und damit die Möglichkeit einer effektiven Therapie bislang nicht geklärt. Bekannt ist, dass es während der Genese der Präeklampsie zu einer unzureichenden Pseudovaculogenese (Kumar 1962) und damit einhergehender Ischämie des fetalen Anteils der Plazenta kommt (Caniggia 2000). Wie in Kapitel 1.2.1 ausführlich erläutert, soll diese placentäre Ischämie über diverse Mediatoren zu der bekannten Präeklampsiesymptomatik führen. Einer dieser Mediatoren ist die lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1 (sFlt-1).

sFlt-1 wirkt als kompetitiver VEGF/PlGF-Rezeptor-Antagonist (O'Brien 2013). Es wird angenommen, dass sFlt-1 durch hypoxische Syntzyotrophoblastzellen produziert wird und eine maternale endotheliale Dysfunktion induziert, die den präeklampsischen Hypertonus generiert (Wu 2010). Die genaue Wirkung von sFlt-1 ist jedoch noch unklar. Eine Korrelation von erhöhten sFlt-1-Konzentrationen und dem Auftreten von Präeklampsie kann aber als gesichert angesehen werden und wurde in diversen Metaanalysen beschrieben (Maynard 2005; Young 2010; George 2011). 2010 gelang es erstmals dem Uniklinikum Köln, in Zusammenarbeit mit der Harvard Medical School, eine Präeklampsie zu therapieren, indem sFlt-1 apheretisch aus dem Blut der Mutter filtriert wurde (Universität Köln 2010; Ravi 2011). Der Quotient sFlt-1/PlGF stellt darüber hinaus eine Möglichkeit zur Früherkennung der Präeklampsie dar. Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen von Schwangeren mit und ohne Präeklampsie besteht (Verloren 2012). Erste kommerzielle Testverfahren stellen sich als wirksam

heraus (Ohkuchi 2010). So steht es nahezu außer Frage, dass sFlt-1 eine bedeutende Stellung in der Pathogenese der Präeklampsie einnimmt. Daher lag es nahe, sFlt-1 als Indikator für die Wirksamkeit der in dieser Arbeit getesteten Substanzen, bezogen auf eine Therapie der Präeklampsie, zu verwenden.

Die Plazenta stellt ein essentielles Organ für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft dar. Sie dient nicht nur der Versorgung des Feten, sondern ist auch Produzent wichtiger Hormone und Mediatoren (Lüllmann-Rauch 2006). Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, gehören dazu unter anderem auch Östradiol und Progesteron. Der Syntzytiotrophoblast, bestehend aus aggregierten Trophoblastzellen, übernimmt die Aufgabe der Hormonproduktion (Simpson 1981). Da das in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Modell auf Trophoblastzellen (Kliman 1986) basierte, bestand die Möglichkeit, durch die Überprüfung der Hormonspiegel in den Kulturen eingeschränkt Rückschlüsse auf die Funktionalität einer *in vivo* Plazenta zu ziehen. Zusätzlich wurden weitere Methoden wie die pH-Wert-Messung in Kultur sowie ein Zytotoxizitäts- und Vitalitätstest zur Beurteilung der Funktionalität der Trophoblastzellen herangezogen. Zusammengefasst erlaubten diese Methoden eine Aussage über positive wie negative Effekte der getesteten Substanzen *in vitro*.

Wie im Vorangegangenen beschrieben, existieren aktuell nur symptomatische Therapieformen der Präeklampsie. Obwohl verschiedene Ansätze zur ursächlichen Therapie und Prophylaxe untersucht wurden, konnte bislang in klinisch prospektiven Studien keine Substanz den gewünschten Therapieerfolg erzielen (George 2011). In dieser Arbeit wurden daher an einem *in vitro* Modell drei weitere Substanzen untersucht, die möglicherweise in einer kausalen Therapie Verwendung finden könnten. Die Eigenschaften einer solchen Substanz waren dabei klar definiert. Applikation der Substanz musste zu einer Verringerung der sFlt-1-Spiegel in Kultur bei gleichzeitig unbeeinträchtigter Funktionalität und Vitalität der Trophoblastzellen führen. Bei den untersuchten Substanzen handelte es sich um (+/-)-Nikotin, Acetylsalicylsäure und Triamcinolon. Im Folgenden werden die Ergebnisse bezogen auf jede Substanz diskutiert.

Nikotin

Schon lange ist bekannt, das rauchende Schwangere ein wesentlich verringertes Risikopotential für eine Präeklampsieerkrankung aufweisen (Lindqvist 1999). In diversen Studien und Metaanalysen in der internationalen Literatur finden sich Angaben von 41 % (Conde-Agudelo 2000) bis zu 50

% (England; Zhang 2007) Risikoreduktion durch Rauchen. Dabei scheint auch die Menge der gerauchten Zigaretten einen Einfluss zu nehmen. Es konnte festgestellt werden, dass die Quantität der täglich gerauchten Zigaretten mit der Reduktion des Präeklampsierisikos positiv korreliert. Verglichen wurden Patientinnen die mehr oder weniger als zehn Zigaretten am Tag rauchten (Conde-Agudelo 1999). Eine umfassende schwedische Studie stellte außerdem fest, dass Raucherinnen, die in der Spätschwangerschaft (ab 32. SSW) das Rauchen einstellen, keine Verringerung des Präeklampsierisikos erwarten können. Frauen, die jedoch vor Beginn der Schwangerschaft mit dem Rauchen anfangen, erhalten diesen Vorteil. (Wikstrom 2010). Sämtliche Studien hielten dazu an, den Einfluss des Rauchens auf die Entwicklung der Präeklampsie weiter zu untersuchen.

Der Zigarettenrauch enthält ca. 4.500 verschiedene Substanzen (Mohan 2002). Welcher dieser Stoffe für die Reduktion des Präeklampsierisikos verantwortlich ist, das heisst durch welche Mechanismen Rauchen das Risiko, an Präeklampsie zu erkranken, senkt, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Es existieren jedoch verschiedene Ansätze zur Erklärung des klinischen Bildes. Viele dieser Hypothesen beschäftigen sich mit Nikotin als einem der Hauptbestandteile des Zigarettenrauches. Eine dieser Theorien ist die Warkentin-Hypothese. B. Warkentin postuliert darin, das Nikotin in einem frühen Stadium den Feten schädigt und durch die verminderten Versorgungsansprüche an die Plazenta eine Präeklampsie unwahrscheinlich wird (Warkentin 1994). Andere Erklärungsversuche bezogen sich auf die reduzierte Wirkung von TNF- α und IL-2 durch Nikotin (Hamai 1997). Auch wurde der Einfluss des Nikotins auf die allgemeine Zytokinproduktion untersucht. Die Arbeitsgruppe um Dowling et al. sah hier einen Zusammenhang zwischen der cholinerg agonistischen Wirkung des Nikotins, die zu einer Reduktion der Zytokinproduktion via NF κ B führen soll und einem gesteigerten Schutz vor schwangerschaftsinduziertem Hypertonus und Präeklampsie (Dowling 2007).

Andererseits ist die aktuelle Studienlage zur Erklärung des Einflusses von Zigarettenrauch auf den Verlauf der Präeklampsie nicht nur auf Nikotin beschränkt. Eine kanadischen Studie von Bainbridge et al. erklärte den positiven Effekt des Rauchens mit der erhöhten Konzentration von CO, das über verschiedene Mechanismen protektiv auf die Plazenta wirken soll (Bainbridge 2005). Des Weiteren konnte bei Patientinnen, die Schnupftabak anstelle von Zigaretten konsumierten, keine Verringerung des Präeklampsierisikos festgestellt werden. Da der Hauptbestandteil des

Schnupftabaks ebenfalls Nikotin ist, folgerten die Verfasser dieser Studie, dass Nikotin nicht für den protektiven Effekt des Rauchens verantwortlich ist (Wikstrom 2010).

Einer der Aspekte dieser Arbeit bestand daher darin, den Einfluss des Nikotins auf humane Throphoblastzellen und damit auch auf die Pathogenese der Präeklampsie weiter zu untersuchen. Bereits 2010 konnten Kwon et al. in einer *in vitro*-Studie unter Gebrauch der kommerziell zu erwerbenden Throphoblastenzelllinie 3A eine Verringerung der sFlt-1-Konzentrationen unter Applikation von reinem Nikotin feststellen (Kwon 2010). Wie im Vorangegangenen beschrieben, ist eine Reduzierung der sFlt-1-Spiegel mit einer Reduktion der Präeklampsiesymptomatik assoziiert. Diese Arbeit konnte die Ergebnisse von Kwon et al. in humanen Throphoblastzellkulturen bestätigen. Nikotin (3 mol/l) zeigte sowohl in den Kulturen aus Norm-Plazenten als auch aus Präeklampsie-Plazenten eine hochsignifikante bzw. sehr signifikante Verringerung der sFlt-1-Spiegel. Die Ergebnisse legen daher einen Einfluss des Nikotins im Zigarettenrauch über eine Verringerung der sFlt-1-Spiegel nahe.

Möglicherweise wurde die Verringerung der sFlt-1 Spiegel aber auch durch eine generalisierte Verringerung des Zellstoffwechsels bedingt. Zur Klärung dieser Überlegung können die Ergebnisse der Funktionsteste herangezogen werden. Nikotingabe (3mmol/l) verursachte eine hochsignifikante bzw. sehr signifikante Verringerung der Konzentrationen von Östradiol und Progesteron in Kulturen aus Normschwangerschaften und zeigte die niedrigsten Werte für Östradiol in den Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaftsmaterial. Die Spiegel von Progesteron in diesen Kulturen zeigten jedoch keine auffällige Verringerung. Des Weiteren wurden die höchsten Glucosespiegel, d.h. eine niedrige Zellaktivität, im Vergleich aller Zellkulturen in den Ansätzen mit Nikotin gemessen. Nikotingabe verursachte eine zum Teil hochsignifikante pH-Wert-Erhöhung in allen Kulturen. Im Gegensatz dazu ergaben der LDH-Zytotoxizitätstest und der MTT-Vitalitätstest ein anderes Bild. Bei der Nikotinkonzentration von 3 mmol/l war die Zytotoxizität um 34 % geringer als im Kontrollwert und die Vitalität nicht signifikant verringert. Ähnlich ambivalent verhielten sich die Zellkulturen bei verringerter Nikotindosis um den Faktor 1000. Hier konnte eine erhöhte Zytotoxizität und eine verringerte Vitalität festgestellt werden. Der Zellmetabolismus war jedoch in einem Maße gesteigert, das dies nur unzureichend mit einer erhöhten Apoptoserate zu erklären wäre. Zusammenfassend kann daher in dieser Arbeit eine absolute Verringerung des Zellstoffwechsels unter Nikotinapplikation nicht festgestellt werden. Die

ermittelten Werte legen zwar eine Beeinträchtigung der plazentären Funktion durch Nikotin nahe, aber erlauben keine Aussage darüber, ob diese die Verringerung der sFlt-1-Spiegel ursächlich bedingt ist. Die bekannten Nebenwirkungen des Nikotinkonsums in der Schwangerschaft, wie etwa gehemmtes Wachstum des Feten, untersucht von Mitchell et al. (Mitchell 2002; Nafstad 1998), könnten jedoch durch die beeinträchtigte Plazentafunktion gefördert werden.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit bestätigen, dass Nikotin eine Verringerung der sFlt-1-Spiegel in *in vitro*-Kulturen von humanen Trophoblastzellen bewirkt. Gleichzeitig führte die Applikation von Nikotin in den Kulturen zu funktioneller Einschränkung der Trophoblasten. In Kombination mit dem Wissen um die bekannten klinischen Nebenwirkungen des Nikotins legen diese Ergebnisse einen uneingeschränkten klinischen Einsatz des Nikotins in der Präeklampsieprophylaxe und Therapie nicht nahe. Möglicherweise liegt jedoch eine Therapieoption in einer Anpassung bzw. Verringerung der Dosis von Nikotin, wie 1999 von Lindqvist et al. vorgeschlagen (Lindqvist 1999). Die Suche nach Strukturanaloga zu Nikotin, wie etwa dem Lobulinsulfat, die weniger Nebenwirkungen im Schwangerschaftsverlauf verursachen und das Potential zur Verringerung von sFlt-1 besitzen, könnte ebenfalls Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.

Acetylsalicylsäure

Acetylsalicylsäure (ASS) steht schon seit über 30 Jahren im wissenschaftlichen Fokus mit Bezug auf die Prävention der Präeklampsie und wurde wie keine zweite Substanz zu dieser Thematik untersucht (Askie 2007). Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, sind eine fehlerhafte Pseudovaculogenese und eine gestörte maternale endotheliale Dysfunktion mit assoziierter plazentärer Ischämie maßgeblich an der Pathogenese der Präeklampsie beteiligt. Diese Prozesse führen zu einer Thrombozytenaktivierung und einer Induktion des Gerinnungssystems (Janes 1995). ASS wirkt als Thrombozytenaggregationshemmer und vermindert die Thromboxansynthese (Masotti 1979; Thorp 1988). Die Hypothese zur Wirkungsweise von ASS besagt daher, dass ASS gegen Vasokonstriktion und pathologische Blutkoagulation in der Plazenta effektiv eingesetzt werden kann (Beilin 1986). Es kommt zu einer ungehinderten Entwicklung der Spiralarterien des Uterus und eine ausreichende Perfusion der Plazenta kann gewährleistet sein. Das Auftreten einer Präeklampsie würde somit verhindert werden. Des Weiteren wird ein

Missverhältnis von Prostacyclin und Thromboxan-A₂ in der präeklampsischen Plazenta diskutiert. Niedrig dosiertes ASS (50 - 150 mg/d) könnte dieses Verhältnis durch Inhibition der Thromboxan-A₂-Synthese zu Gunsten des Prostacyclin verschieben und somit die plazentäre Durchblutung fördern (Dekker 1993). Im Laufe der Präeklampsieforschung wurden daher zahlreiche klinische Studien zum Wirkpotential von niedrig dosiertem ASS durchgeführt, die ein ambivalentes Gesamtbild ergeben.

1998 wurde in einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie mit 3.647 Teilnehmerinnen am „Queen Elisabeth Hospital“ auf Barbados die Wirkung der täglichen Gabe von 75 mg ASS zur Prävention der Präeklampsie untersucht. Die Patientinnen befanden sich bei Beginn der Studie zwischen der zwölften und 32. Schwangerschaftswoche. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich Präeklampsieinzidenz, Frühgeburtenrate, Geburtsgewicht und neonataler Mortalität zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ermittelt werden (Rotchell 1998). In weiteren groß angelegten multizentrischen (n=7) Studien, unter Einbeziehung von über 27.000 Patientinnen, konnte ebenfalls keine Reduktion des Präeklampsierisikos bei Gabe von niedrig dosiertem ASS (50 -150 mg/d) festgestellt werden (Sibai 1998). Eine erst kürzlich durchgeführte, ebenfalls randomisierte und placebokontrollierte, Doppelblindstudie kam zu ähnlichen Ergebnissen. Untersucht wurden 121 Frauen mit Hochrisikofaktoren für Präeklampsie und einer auffälligen Duplex-Sonografie der Uterusarterien. Die Studie begann ab der zwölften bzw. 13. Schwangerschaftswoche und es wurden 100 mg/d ASS appliziert. Es konnte kein statistisch signifikanter Effekt des ASS für die Prävention des Präeklampsie festgestellt werden (Villa 2013). Eine Metaanalyse, die im Rahmen der gleichen Studie durchgeführt wurde, konnte jedoch zeigen, dass niedrig dosierte ASS-Gabe ab der 16. Gestationswoche für Frauen mit auffälliger Duplex-Sonografie der Uterusarterien, das Risiko an Präeklampsie zu erkranken statistisch signifikant senken konnte. Das Risiko an einer Präeklampsie im dritten Trimenon oder kurz vor der Geburt zu erkranken konnte jedoch nicht reduziert werden. Die Ergebnisse der Metaanalyse von Villa et al. werden durch die von Bujold et al. unterstützt. Diese Arbeitsgruppe führte eine Metaanalyse von insgesamt 34 randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudien mit einer Patientinnenzahl von insgesamt 11.348 Frauen durch. Ihre Ergebnisse bestätigen, dass die Einnahme von niedrig dosiertem ASS ab der 16. Schwangerschaftswoche oder davor zu einem signifikant reduziertem Präeklampsierisiko führt (Bujold 2010).

Diese klinischen Studien könnten die Hypothese bestätigen, dass ASS in der frühen Phase der Plazentation durch die Thrombozytenaggregation sowie die Gerinnungshemmung eine maternale endotheliale Dysfunktion verringert und die Pseudovakuologese fördert. Die plazentäre Ischämie, als Ausgangssituation für eine Präeklampsie, würde damit weniger stark ausgeprägt sein. Nach der 16. Schwangerschaftswoche sind diese Prozesse jedoch schon weitgehend abgeschlossen. Möglicherweise nimmt ASS aber auch über andere Signalwege Einfluss auf die Pathogenese der Präeklampsie. Obwohl humane Throphoblastzellen bereits unter dem Aspekt der Thromboxan-, Proctacyclin- und Prostaglandinsynthese untersucht wurden, (Nelson 1989; Johnson 1997; Cervar 1997) wurde erst mit dieser Studie die Wirkung des ASS auf den Präeklampsiemarkers sFlt-1 beleuchtet.

Die Gabe von ASS ($8,3 \times 10^{-5}$ mol/l) bewirkte keine signifikante Verringerung der sFlt-1-Konzentrationen in den Zellkulturen. Dies traf sowohl für Kulturen aus Norm- als auch auf Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft zu. Demnach konnte kein positiver Effekt der ASS auf die Entwicklung der Präeklampsie im Sinne einer sFlt-1-Spiegel-Verringerung in den *in vitro*-Versuchen nachgewiesen werden. Eine Risikoreduktion durch ASS in der Präeklampsiepathogenese ist demnach nur unwahrscheinlich auf einen Einfluss auf sFlt-1 zurückzuführen.

Da jedoch eine Präeklampsierisikoreduktion mit einer frühen Einnahme von ASS assoziiert wird, würde sich die Frage nach möglichen Nebenwirkungen in der Schwangerschaft und nach eventueller Teratogenität stellen.

Slone et al. untersuchten bereits 1976 einen möglichen Zusammenhang zwischen ASS und Teratogenität (Slone 1976). Die Arbeitsgruppe untersuchte 50.282 Schwangerschaften und kam zu dem Ergebnis, dass eine mögliche teratogene Wirkung der ASS ausgeschlossen werden könnte. Dagegen fanden Corby et al. in einer Metaanalyse 1978 heraus, dass ASS-Einnahme im letzten Trimenon zu Komplikationen wie verlängerter Geburtszeit und vermehrten antepartalen und postpartalen Blutungen führen kann (Corby 1978). Die Daten dieser Arbeit zeigen kaum negative Ergebnisse in den Untersuchungen der Zellkulturen unter ASS-Gabe. Die Hormonspiegel von Östradiol und Progesteron lagen bei ASS-Zusatz zu Normschwangerschaftsmaterial immer über denen des Vergleichswertes. Außerdem bewirkte ASS-Gabe eine erhöhte Konzentration von Östradiol in den Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaftsmaterial. Die pH- Werte unter ASS-

Applikation lagen immer in Bereichen des Vergleichswertes und wiesen keine Auffälligkeiten auf. Auch das spricht für eine relativ risikofreie Nutzung von ASS. Der über die Glucose bestimmte Zellmetabolismus war nur leicht verringert. Die Zellen zeigten eine sehr hohe Vitalität und es konnte nahezu keine Zytotoxizität festgestellt werden. Einzig eine Verringerung der Progesteron-Spiegel in den Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft konnte festgestellt werden. Bei der Verringerung der ASS-Konzentration um den Faktor 1.000 konnten keine signifikanten Unterschiede zur höheren Konzentration in den Versuchen ermittelt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann von keiner wesentlichen Beeinträchtigung der placentären Funktion durch ASS ausgegangen werden. Eine mögliche Teratogenität durch Veränderung der Zellfunktion ist nicht zu erwarten.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass ASS keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration von sFlt-1 in humanen Trophoblastzellkulturen hat. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ASS die Reduktion des Präeklampsierisikos bei Einnahme ab der 16. Schwangerschaftswoche nicht über dieses Protein beeinflusst. Eine Beeinträchtigung der zellulären Funktion konnte unter ASS-Applikation nicht festgestellt werden. Mit dem Fokus auf die Beeinträchtigung der placentären Funktion ist daher ein Einsatz während der Schwangerschaft möglich.

Triamcinolon

Die Plazenta stellt ein Zielorgan für Glukokortikoide dar (Reinisch 1978). Glukokortikoide werden sowohl von der maternalen als auch der fetalen Nebennierenrinde produziert und nehmen im Verlauf der Schwangerschaft vielseitig Einfluss auf Plazenta und Fet. Sie beeinflussen unter anderem die Implantation (Prostaglandinsynthese) (Kennedy 1983) sowie die Entwicklung und Reifung fetaler Organe. Glukokortikoide nehmen Einfluss auf die Expression von Rezeptoren, Enzymen, Transportern, Wachstumsfaktoren, Cytoskelett- und Verbindungsproteinen, intrazelluläre Signalwege und auf die Hormonproduktion der reifen Plazenta (Emin 2012). Synthetische Glukokortikoide wie Dexamethason oder Triamcinolon können eingesetzt werden, um die physiologischen Effekte der körpereigenen Glukokortikoide zu verstärken. Momentan gibt es während der Schwangerschaft zwei wesentliche Indikationen für deren Anwendung: Behandlung von Frauen mit dem Risiko einer Frühgeburt und die prophylaktische Therapie von Feten mit dem

Risiko einer kongenitalen Nebennierenhyperplasie (Kipmen-Korgun 2012). Das Frühgeburtsrisiko aller Schwangerschaften beträgt ca. 12,5 % in der westlichen Welt (Ananth 2006) und etwa 7-10 % aller Schwangeren mit Frühgeburtsrisiko werden präpartal mit Glucokortikoiden behandelt (Matthews 2004). Wesentliche Vorteile einer kurzzeitigen Glucokortikoidtherapie sind die Reduktion der fetalen Mortalität und Morbidität, eine Verringerung der Inzidenz von Atemnotsyndromen der Neugeborenen durch Beschleunigung der Lungenreife sowie eine Abnahme intraventrikulärer Blutungen bei Frühgeborenen (Sloboda 2005). Bei längerer Glucokortikoidtherapie, etwas bei einer behandlungspflichtigen Grunderkrankung der Mutter (Asthma, SLE), kann es jedoch zu beträchtlichen Nebenwirkungen für den Feten kommen. Vor allem eine intrauterine Wachstumsrestriktion (IUGR), (Reinisch 1978; Unek 2012) aber auch kardiovaskuläre (Barker 1997) sowie metabolische und neuroendokrine Erkrankungen im späteren Leben (Seckl 2004) können die Folge sein.

Obwohl in der internationalen Literatur viele Untersuchungen zum Einfluss von Glucokortikoiden in der Schwangerschaft existieren, gibt es nur wenige Studien, die deren Einfluss auf die Plazenta und damit auf die Entwicklung der Präeklampsie in den Fokus setzten. Auch in internationalen und nationalen Richtlinien findet sich kein klarer Standpunkt zur Thematik der Anwendung von Glucokortikoiden zur Prophylaxe und Therapie der hypertonen Schwangerschaftserkrankungen (American Congress of Obstetricians and Gynecologists 2002; Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2013).

In dieser Arbeit stand daher die Frage zur Diskussion, ob eine Anwendung von synthetischen Glucokortikoiden in einem *in vitro*-Plazentamodell eine Verringerung des Präeklampsiemarkers sFlt-1 bewirken könnte. Bei gleichzeitig unauffälligen Funktions- und Vitalitätstestungen in den Kulturen ließe eine solche Verringerung Rückschlüsse auf einen möglichen klinischen Einsatz der Glucocortikoide in der Präeklampsitherapie zu.

Als zu untersuchendes synthetisches Glucokortikoid wurde Triamcinolon (TA) gewählt. Diese Wahl fand im Wesentlichen aus drei Gründen statt. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass Triamcinolon spezifisch an den Glucokortikoidrezeptor im plazentären Zytosol bindet (Speeg 1979) und dies mit höherer Affinität als Dexamethason (Dancis 1980). Des Weiteren wird es nicht durch 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 aktiviert (Feinstein 1999). Dieses Enzym wird

während der Gestation vornehmlich vom Trophoblasten gebildet (Driver 2001) und wandelt aktives Cortisol in inaktives Cortison um (Stewart 1994). Physiologisch schützt es so Mineralcorticoidrezeptoren vor Überaktivierung (Arriza 1987), nimmt aber auch Einfluss auf die Wirkung von synthetischen Glukokortikoiden (Brown 1996). Ein weiterer Grund für die Wahl des Triamcinolons ist seine Anwendung in früheren Studien und die darin nachgewiesene Eigenschaft, Einfluss auf die plazentäre Funktion zu nehmen. (Hahn 1994; Mandl 2006; Kipmen-Korgun 2012).

Zu diesen Studien zählt eine Arbeit von Mandl et al. aus dem Jahr 2006. Es wurde der Einfluss von TA auf Chorioncarcinom Zelllinien (BeWo, JEG3, JAR), die als Modelle für humane Trophoblastkulturen dienten, untersucht. BeWo- und JEG-3-Zelllinien exprimieren nachweislich Glukokortikoidrezeptoren und wurden mit ähnlichen Konzentrationen wie in der vorliegenden Arbeit (0,5 μ M, 5 μ M und 50 μ M TA) für 48 h inkubiert. Als Kontrolle wurden JAR-Zellkulturen genutzt, die keine Glukokortikoidrezeptoren exprimieren. Die Bestimmung der Zellproliferation, des Zellinvasionspotentials und der endokrinen Aktivität erfolgte durch Zellzählung, Messung des Zellzyklusproteins Cyclin B und der Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 sowie der Bestimmung von β -HCG im Kulturmedium. Als Ergebnis der TA-Applikation konnte eine Vermehrung toter Zellen in Kultur, eine Verringerung des Invasionspotentials der BeWo- und JEG-3-Zellkulturen und eine erniedrigte Proliferationsrate im Vergleich mit der Kontrolle festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe kommt zu dem Schluss, dass aufgrund ihrer Ergebnisse eine Glukortikodstherapie mit TA während der Schwangerschaft nur unter Vorbehalt erfolgen sollte. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen diese Ansicht. TA-Applikation zeigte auch bei den hier verwendeten humanen Trophoblastzellen Ergebnisse, die nicht auf eine physiologische Plazentafunktion schließen lassen können. In den Zellkulturen aus Normschwangerschaften lagen die Hormonspiegel von Östradiol und Progesteron unter denen des Vergleichswertes. Die pH-Werte lagen im Normbereich. Jedoch zeigten die Ansätze mit TA eine Verringerung der Vitalität und des Glucosestoffwechsels sowie eine Erhöhung der Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrolle. Diese *in vitro*-Ergebnisse sprechen daher nicht für eine TA-Therapie während der Schwangerschaft.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Untersuchung von Hahn et al. aus dem Jahr 1994. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt von TA auf verschiedene vasoaktive Enzyme die vom Trophoblasten produziert werden. Genau wie in dieser Arbeit wurden dazu Trophoblastzellen nach

dem Methode von Kliman et al. aus humanen Plazenten isoliert. Nach Zugabe von 0,1 - 10 μ M TA wurden diese Zellen für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgten Messungen der plazentären α -Glutamyl-Aminopeptidase, mikrosomaler Alanyl-Aminopeptidase, Dipeptidyl-Peptidase IV, Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase. Nach Auswertung der Ergebnisse sieht diese Studie ebenfalls eine Gefahr in der Anwendung von Triamcinolon während der Schwangerschaft, da Nebenwirkungen von Glukokortikoid-induzierten Feedbackmechanismen und damit einhergehende veränderte Syntzytiotrophoblastenaktivität großes Nebenwirkungspotential hätten.

Des Weiteren legen Hahn et al. nahe, dass durch den Einfluss von TA und die damit einhergehende teilweise Induktion der oben genannten Enzyme ein plazentärer Bluthochdruck erzeugt werden könnte, ähnlich dem der Präeklampsie. Ob dadurch die Entwicklung einer Präeklampsie gefördert würde, wurde jedoch nicht eingehender untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die sich nicht mit den plazentären vasoaktiven Enzymen beschäftigen, sondern den Fokus auf den Präeklampsiemarker sFlt-1 legen, lassen bei TA-Applikation *in vitro* keinen positiven Einfluss auf die Entwicklung der Präeklampsie erkennen. TA führte zu keiner signifikanten Verringerung der sFlt-1-Spiegel in allen getesteten Zellsuspensionen. In den Ansätzen aus Normschwangerschaftsplazenten kam es sogar zu einer Steigerung der sFlt-1-Konzentrationen gegenüber dem Vergleichswert. Ein negativer Einfluss einer TA-Applikation *in vivo* auf die Pathogenese einer Präeklampsie ist daher nicht auszuschließen.

Möglicherweise läge eine Alternative jedoch in der Anwendung von strukturell veränderten Glukokortikoiden. 2012 führten Korgun et al. eine Metaanalyse zum Thema des Einflusses von Glukokortikoiden auf die fetale und plazentäre Entwicklung durch. In dieser Arbeit wird zwar auf den starken Einfluss des TA auf die Expression verschiedener Glukoserezeptoren und die damit einhergehende fetale Wachstumsretardation hingewiesen, aber auch auf den Einfluss von Glukokortikoiden auf die Produktion von VEGF und dessen Rezeptoren. Aktuelle Studien belegen daher, dass Glukokortikoide über den MAPK und Pi3K/Akt Signalweg die Expression von VEGF und VEGFR fördern. Da sFlt-1 in seiner Funktion als löslicher VEGF-Rezeptor dieses bindet, inaktiviert und damit maßgeblich zur Pathogenese der Präeklampsie beiträgt, läge in der vermehrten Produktion von VEGF und dessen physiologischen Rezeptoren, induziert durch ein synthetisches Glukokortikoid, eventuell ein Therapieansatz für die Präeklampsie.

Triamcinolon kann jedoch, basierend auf den *in vitro*-Ergebnissen, für einen langfristigen Gebrauch in der Schwangerschaft nicht empfohlen werden. Eine Reduktion des Präeklampsie marker sFlt-1 war nicht gegeben und die Ergebnisse der Funktions- und Vitalitätstests bestätigen, die bereits aus früheren Studien bekannte Verringerung der Zellaktivität und untermauern das klinische Bild des Nebenwirkungsspektrums.

6 Zusammenfassung

Zielstellung

Ziel dieser *in vitro*-Studie war es, den Einfluss von (+-)-Nikotin, Acetylsalicylsäure und Triamcinolon auf humane Trophoblastzellen zu untersuchen. Hierbei galt es, eine Substanz zu identifizieren, die den bekannten Präeklampsiemarker lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1 (sFlt-1) *in vitro* senkt und gleichzeitig keine Funktions- und Vitalitätseinschränkung der Trophoblastzellen verursacht. Diese Versuchsreihen sollten sowohl an Plazentamaterial aus Norm- als auch aus Präeklampsieschwangerschaft durchgeführt werden, sowie mit verschiedenen Substratkonzentrationen.

Methodik

Die Trophoblastzellen wurden nach einer modifizierten Methode von Kliman et al. (1986) aus geborenen Plazenten isoliert und anschließend kultiviert. Der Nachweis, ob de facto Trophoblastzellen isoliert wurden, wurde immunhistochemisch mit dem monoklonalen Mausantikörper CK 7 erbracht. Jeweils nach 24, 48 und 72 h Inkubation unter physiologischen Bedingungen wurden die Expression von sFlt-1, Östradiol und Progesteron ermittelt, der pH-Wert der Kulturen bestimmt und die eventuelle Synzytzenbildung lichtmikroskopisch fotografiert. Des Weiteren wurden diverse Funktions-, Vitalitäts- und Zytotoxizitätstests durchgeführt, um eine zellschädigende Wirkung der Substanzen zu untersuchen. Hierzu zählten die Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität, des Glucosemetabolismus und des Umsatzes von Tetrazolium-Salz.

Ergebnisse

Unter Applikation von Nikotin in verschiedenen Konzentrationen zeigte sich eine sehr bis hochsignifikante Verringerung der sFlt-1-Spiegel in Trophoblastzellkulturen aus Norm- und Präeklampsieschwangerschaften. Die gleichzeitig durchgeführten Funktionstests boten ein ambivalentes Bild für die getesteten Nikotinkonzentrationen und legen eine zum Teil hochsignifikante Beeinträchtigung der placentären Funktion nahe. Eine absolute Verringerung des Zellstoffwechsels konnte jedoch nicht festgestellt werden. Unter Gabe von ASS konnte keine signifikante Verringerung der sFlt-1-Konzentrationen in den Ansätzen erzielt werden. Der einzige auffällige Parameter unter Applikation von ASS war ein Abfall der Progesteronkonzentration in

Trophoblastzellkulturen aus Präeklampsieschwangerschaft. Darüber hinaus konnten keine Beeinträchtigungen der Zellfunktion festgestellt werden. Triamcinolonapplikation verringerte die sFlt-1-Spiegel ebenfalls nicht signifikant. Es kam hier zum Teil sogar zu einer Erhöhung der Werte. Die negativen Ergebnisse in den Zytotoxizitäts- und Vitalitätstests legen darüber hinaus eine schädliche Wirkung auf die Plazenta nahe.

Schlussfolgerung

Die Arbeit konnte bestätigen, dass Nikotin Einfluss nehmen kann auf die Expression des sFlt-1 in *in vitro*-Trophoblastzellkulturen. Damit bestätigt sie frühere Studien und kann so zur Erklärung des Einflusses von Zigarettenrauchen auf die Pathogenese der Präeklampsie herangezogen werden. Die teilweise hochsignifikant negativ ausgefallenen Funktionstests der Trophoblastzellkulturen lassen jedoch Nikotin als therapeutische Option sehr unwahrscheinlich erscheinen und bestätigen die bekannten Nebenwirkungen des Nikotinkonsums in der Schwangerschaft. Möglicherweise liegt in der Identifizierung des Nikotins als sFlt-1-Senker jedoch der Ansatz zu weiteren Studien mit veränderten Konzentrationen oder mit bekannten Strukturanaloga, wie dem Lobulinsulfat. ASS zeigte weder einen Einfluss auf sFlt-1 noch konnte eine Beeinträchtigung der Trophoblastzellfunktion gemessen werden. Daher ist anzunehmen, dass die in anderen Studien beobachtete Reduktion des Präeklampsierisikos von ASS nicht durch einen placentären Mechanismus verursacht wird. Triamcinolongabe reduzierte die sFlt-1-Spiegel ebenfalls nicht. Allerdings zeigten die Funktionstests eine bereits aus früheren Studien bekannte Verringerung der Zellaktivität und untermauern das klinische Nebenwirkungsspektrum. Trotzdem sollte der Fokus zukünftiger Studien zur Thematik synthetischer Glukokortikoide nicht außer Acht lassen, dass diese bedeutenden Einfluss auf die Expression des von sFlt-1 gebundenen VEGF nehmen können.

7 Thesen zur Promotionsschrift

Thema: Funktionelle Untersuchungen an Trophoblastzellkulturen zur Prophylaxe und Therapie der Präeklampsie – eine *in vitro* Studie

eingereicht von Ferdinand Schumacher aus Lychen

1. Präeklampsie stellt im Schwangerschaftsverlauf eine schwerwiegende Komplikation dar und ist einer der Hauptgründe für maternale und perinatale Morbidität und Mortalität weltweit. Die Pathogenese ist ungeklärt. Eine ursächliche, effektive Therapie existiert nicht.
2. Die lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1 (sFlt-1) ist ein Protein, das von den Trophoblastzellen des Synzytiotrophoblasten produziert wird und als VEGF-Rezeptor-Antagonist, an der Pathogenese der Präeklampsie beteiligt ist.
3. Eine Isolation von Trophoblastzellen aus geborenem Plazentamaterial und eine anschließende Kurzzeitkultivierung sind möglich. Die Expression von sFlt-1 kann in diesen Kulturen gemessen werden.
4. Gelänge es, eine Substanz zu identifizieren, die sFlt-1-Spiegel in Trophoblastzellkulturen *in vitro* senken könne und gleichzeitig keinen negativen Effekt auf Funktion und Vitalität der Zellen ausübt, könnte darin der Ansatz für eine mögliche *in vivo* Prophylaxe und/oder Therapie der Präeklampsie liegen.
5. Zigarettenrauchen vor und während der Schwangerschaft kann das Risiko, an Präeklampsie zu erkranken, um bis zu 50% verringern. Vorangegangene *in vitro* Studien legen einen Einfluss von Nikotin auf die Expression von sFlt-1 nahe.
6. Acetylsalicylsäure wird seit über 30 Jahren zur Prävention der Präeklampsie untersucht. Ein positiver Einfluss auf die Plazentation und Pseudovacuoogenese konnte nachgewiesen werden. Ein Einfluss auf plazentäre Proteine ist möglich, wurde bislang jedoch nicht untersucht.

7. Die Plazenta stellt ein glukokortikoidsensitives Organ dar. Synthetische Glukokortikoide finden bereits Anwendung in der Schwangerschaft und nehmen Einfluss auf die Hormonproduktion der Trophoblasten. Triamcinolon zeigte bereits in vorangegangenen *in vitro*-Studien eine Wirkung auf die Trophoblastenfunktion und könnte daher auch die Expression von sFlt-1 alternieren.
8. Nikotin, in allen getesteten Konzentrationen, führt zu einer hochsignifikanten bzw. sehr signifikanten Verringerung der sFlt-1-Konzentrationen in *in vitro*-Kulturen, sowohl aus Norm- als auch aus Präeklampsieschwangerschaftsmaterial. Die Funktionstests stellen sich ambivalent dar, lassen aber keinen Rückschluss auf eine uneingeschränkte Zellfunktion zu.
9. Sämtliche getestete Konzentrationen von Acetylsalicylsäure verringerten die Expression von sFlt-1 nicht. Dies galt für Material aus Norm- und Präeklampsieschwangerschaften. Eine Beeinträchtigung der Zellfunktion und Vitalität unter ASS-Gabe konnte nicht festgestellt werden.
10. Die getesteten Triamcinolonkonzentrationen zeigten keinen positiven Einfluss auf die sFlt-1-Spiegel *in vitro*. In den verschiedenen Funktionstests zeigten sich jedoch eine Verringerung der Zellaktivität und eine erhöhte Toxizität.
11. Diese Arbeit bestätigt frühere Studien darin, dass Nikotin der Bestandteil des Zigarettenrauches ist, der für eine protektive Wirkung gegenüber dem plazentär gebildeten sFlt-1 verantwortlich ist. Die Ergebnisse der weiterhin durchgeführten Untersuchungen lassen einen unbedenklichen klinischen Einsatz jedoch als nicht möglich erscheinen. In zukünftigen Studien könnten Versuchsreihen mit veränderten Konzentrationen oder Strukturanaloga des Nikotins im Fokus stehen.
12. Die Reduktion des Präeklampsierisikos durch ASS wird nicht über den sFlt-1-Signalweg bestimmt. Der sehr geringe Einfluss auf die untersuchten Zellparameter lassen Rückschlüsse auf einen wenig ausgeprägten Einfluss der ASS auf die Plazenta zu.

13. Triamcinolon verringerte die Zellvitalität signifikant und zeigte eine ausgeprägte Zytotoxizität. Da eine Verringerung der sFlt-1-Spiegel nicht gegeben war, kann von keinem Nutzen in der Prophylaxe und Therapie der Präeklampsie ausgegangen werden. Da der Einfluss der synthetischen Glucokortikoide auf den VEGF-Signalweg jedoch bekannt ist, wäre eine Untersuchung mit anderen Substanzen dieser Stoffklasse für folgende Studien weiterhin interessant.
14. Keine der untersuchten Substanzen dieser Pilotstudie konnte *in vitro* Ergebnisse erzielen, bezogen auf die untersuchten Konzentrationen, die positive Rückschlüsse auf einen effektiven und dabei gleichzeitig unbedenklichen Nutzen im Rahmen der Prophylaxe und Therapie der Präeklampsie zulassen. Die Identifizierung des Nikotins als sFlt-1-Senker, der Ausschluss eines Einflusses von ASS auf verschiedene Funktionen der Trophoblastzellen und die Auseinandersetzung mit dem synthetischen Glucokortikoid Triamcinolon bieten jedoch vielfältige Ansätze für zukünftige Studien.

8 Literaturverzeichnis

- [1] **Altman D, Carroli G, Duley L et al.** (2002): Do women with preeclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. In *Lancet* (359), S. 1877–1890.
- [2] **American Congress of Obstetricians and Gynecologists** (2002): Practice Bulletin No. 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. In *Obstet. Gynecol.* (99), S. 159–167.
- [3] **Ananth CV, Vintzileos AM** (2006): Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. In *J Matern. Fetal. Neonatal.Med.* (19(12)), S. 773–782.
- [4] **Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G et al.** (1987): Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. In *Science* (237(4812)), S. 268–275.
- [5] **Askie LM, Duley L, Henderson-Smart DJ et al.** (2007): Antiplatelet Agents for Prevention of Pre-eclampsia: A Meta-Analysis of Individual Patient Data. In *Obstet. Gynecol. Surv.* (62), S. 697–'699.
- [6] **Atallah AN, Hofmeyr GJ, Duley L** (2000): Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. In *Cochrane Database Systemic Review* ((2) CD001509).
- [7] **Bainbridge SA, Sidle EH, Smith GN** (2005): Direct placental effects of cigarette smoke protect women from pre-eclampsia: the specific roles of carbon monoxide and antioxidant systems in the placenta. In *Medical. Hypotheses.* (64(1)), S. 17–27.
- [8] **Barker DJ** (1997): Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. In *Br. Med. Bull.* (53(1)), S. 96–108.
- [9] **Barton JR** (2008): Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. In *Obstet. Gynecol.* (112), S. 359–372.
- [10] **Bdolah Y, Lam C, Rajakumar A et al.** (2008): Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (198), S. 428:e1-6.
- [11] **Beilin L** (1986): Aspirin and pre-eclampsia. In *Lancet* (1), S. 328–329.

- [12] **Bergmann A, Ahmad S, Cudmore M et al.** (2010): Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a mouse model. In *J. Clin. Invest.* (14(6B)), S. 1857–1867.
- [13] **Bridges JP, Gilbert JS, Colson D et al.** (2009): Oxidative stress contributes to soluble fms-like tyrosine kinase-1 induced vascular dysfunction in pregnant rats. In *Am. J. Hyperten.* (22(5)), S. 564–568.
- [14] **Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG** (1972): The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. In *Obstet. Gynecol. ann.* (1), S. 177–191.
- [15] **Brown RW, Chapman KE, Kotelevtsev Y et al.** (1996): Cloning and production of antisera to human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. In *Biochem. J.* (313(Pt 3)), S. 1007–1017.
- [16] **Bujold EMM, Roberge SM, Lacasse YMM et al.** (2010): Prevention of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction With Aspirin Started in Early Pregnancy: A Meta-Analysis. In *Obstet. Gynecol.* (116), S. 402–414.
- [17] **Bushimschi C** (2005): Urinary angiogenic cluster hypertensive disorder and identify women with severe preeclampsia. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (192), S. 734–741.
- [18] **Buurma AJ, Turner RJ, Driessen JHM et al.** (2013): Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis. In *Human Reproduction Update.* (19), S. 289–303.
- [19] **Calvin S, Corrigan J, Weinstein L et al.** (1988): Factor VIII: von Willebrand factor patterns in the plasma of patients with pre-eclampsia. In *Am. J. Perinatol.* (5), S. 29–32.
- [20] **Caniggia I, Mostachfi H, Winter J et al.** (2000): Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). In *J. Clin. Invest.* (105), S. 577–587.
- [21] **Cao J, Inoue K, Li X et al.** (2009): Physiological significance of heme oxygenase in hypertension. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (41(5)), S. 1025–1033.
- [22] **Carr DB, Epplein M, Johnson CO et al** (2005): A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (193), S. 965–972.
- [23] **Cervar M, Nelson DM, Kainer F et al.** (1997): Drug actions in preeclampsia: Aspirin, but not magnesium chloride or dihydralazine, differentially inhibits cultured human trophoblast release of thromboxane and prostacyclin without affecting angiotensin II,

- [24] **Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA et al.** (1998): Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. In *Development* (125(5)), S. 813–824.
- [25] **Conde-Agudelo A, Belizán JM** (2000): Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. In *BJOG* (107(1)), S. 75–83.
- [26] **Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizán JM et al.** (1999): Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: A systematic review. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (181 (4)), S. 1026–1035.
- [27] **Contractor SF, Sooranna SR** (1993): Trophoblast Cell Culture as a Model for Studying Placental Function in The Human Placenta. In *Blackwell Scientific Publications*, S. 504–526.
- [28] **Cooper WO, Hernandez-Diaz S, Arbogast PG et al.** (2006): Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. In *N. Eng. J. Med.* (354), S. 2443–251.
- [29] **Coppage KH, Sun X, Baker RS et al.** (2005): Expression of phosphodiesterase 5 in maternal and fetal sheep. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (193 (3, Supplement)), S. 1005–1010.
- [30] **Corby DG** (1978): Aspirin in Pregnancy: Maternal and Fetal Effects. In *Pediatrics* (62(5s)), S. 930–937.
- [31] **Dancis J, Jansen V, Levitz M** (1980): Placental transfer of steroids: effect of binding to serum albumin and to placenta. In *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* (238(3)), S. E208.
- [32] **Davidge ST** (1998): Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. In *Semin. Reprod. Endocrinol.* (16), S. 65–73.
- [33] **Daya D, Sabet L** (1995): The use of cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastics tissue. In *J. Clin. Path.* (95), S. 137–141.
- [34] **de Swiet M** (2000): Maternal blood pressure and birthweight. In *Lancet* (355), S. 81–82.
- [35] **Decker T, Lohmann-Matthes ML** (1988): A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. In *J. Immu. Meth.* (115(1)), S. 61–69.

- [36] **Dekker GA, Sibai BM** (1993): Low-dose aspirin in the prevention of preeclampsia and fetal growth retardation: rationale, mechanisms, and clinical trials. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (168(1 Pt 1)), S. 214-227.
- [37] **Dekker GA, Sibai BM** (1998): Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (179(5)), S. 1359–1375.
- [38] **Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL - Deutsche Hypertonie Gesellschaft** (2008): Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie, S. 69–75.
- [39] **Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe** (2013): S1-Leitlinie zu Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Diagnostik und Therapie
- [40] **Dowling O, Rochelson B, Way K et al.** (2007): Nicotine Inhibits Cytokine Production by Placenta Cells via NFκB: Potential Role in Pregnancy-Induced Hypertension Address correspondence. In *Mol. Med.* (13), S. 576–583.
- [41] **Downing J** (2010): Sildenafil for the Treatment of Preeclampsia. In *Hypertens. Preg.* (29(2)), S. 248–250.
- [42] **Driver PM, Kilby MD, Bujalska I et al.** (2001): Expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes and corticosteroid hormone receptors in primary cultures of human trophoblast and placental bed biopsies. In *Molecular Human Reproduction* (7(4)), S. 357–363.
- [43] **Duckitt K, Harrington D** (2005): Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. In *Br. Med. Journal.* (330), S. 549–550.
- [44] **Emin TK, Aslı O, Gozde U et al.** (2012): The Effects of Glucocorticoids on Fetal and Placental Development. In Qian X (Ed.) (2012): *Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend*. Bristol: InTech-Verlag 2012
- [45] **England L, Zhang J** (2007): Smoking and risk of preeclampsia: a systematic review. In *Front Biosci* (12), S. 2471–2483.
- [46] **Esplin MS, Fausett MB, Fraser A et al.** (2001): Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. In *N. Eng. J. Med.* (344), S. 867–872.
- [47] **Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ** (1991): Oncofetal fibronectin: a trophoblast „glue“ for human implantation? In *J. Path.* (138), S. 537–543.

- [48] **Feinberg RF, Kao LC, Haimowitz JE et al.** (1989): Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI 1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. In *Lab. Invest.* (61), S. 20–26.
- [49] **Feinstein MB, Schleimer RP** (1999): Regulation of the action of hydrocortisone in airway epithelial cells by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. In *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* (21 (3)), S. 403–408.
- [50] **George EM, Bidwell GL** (2013): STOX1: A New Player in Preeclampsia? In *Hypertension* (61(3)), S. 561–563.
- [51] **George EM, Granger JP** (2011): Mechanisms and Potential Therapies for Preeclampsia. In *Curr. Hypertens. Rep.* (13(4)), S. 269–275.
- [52] **Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP** (2007): Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. In *Hyperten.* (50(69)), S. 1142–1147.
- [53] **Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB et al.** (2008): Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. In *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* (294(2)), S. 541–550.
- [54] **Gilbert JS, Verzwylt J, Colson D et al.** (2010): Recombinant vascular endothelial growth factor 121 infusion lowers blood pressure and improves renal function in rats with placental ischemia-induced hypertension. In *Hyperten.* (55(2)), S. 380–385.
- [55] **Hahn T, Graf R, Oney T et al.** (1994): Effects of the synthetic glucocorticoid triamcinolone acetonide on vasoactive hydrolases of the human placenta in vitro. In *Placenta* (15(4)), S. 377–388.
- [56] **Hamai Y, Fujii T, Yamashita T et al.** (1997): Evidence for an Elevation in Serum Interleukin-2 and Tumor Necrosis Factor- α Levels Before the Clinical Manifestations of Preeclampsia. In *American Journal of Reproductive Immunology* (38(2)), S. 89–93.
- [57] **Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM et al.** (2001): Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. In *BMJ* (323), S. 1213–1217.
- [58] **Janes SL, Kyle PM, Redman C et al.** (1995): Flow cytometric detection of activated platelets in pregnant women prior to the development of pre-eclampsia. In *Thromb. Haemost.* (74(4)), S. 1059–1063.
- [59] **Jeschke U, Briese V, Richter DU et al.** (1996): Stimulierungsversuche von Trophoblasten in vitro mit Hilfe von PP14. In *Zentralbl. Geburtshilfe und Neonatol.* (200), S. 199–201.

- [60] **Jeschke U, Richter DU, Hammer A et al.** (2002): Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of the positive carrier protein mucin 1 in the human placenta and trophoblast cells in vitro. In *Histochem. Cell Biol.* (117), S. 219–226.
- [61] **Johnson RD, Polakoski K, Everson WV et al.** (1997): Aspirin induces increased expression of both prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 in cultured human placental trophoblast. In *Am.J. Obstet. Gynecol.* (177(1)), S. 78–85.
- [62] **Kennedy TG** (1983): Prostaglandin E2, adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and changes in endometrial vascular permeability in rat uteri sensitized for the decidual cell reaction. In *Biol. Reprod.* (29), S. 1069–1076.
- [63] **Kipmen-Korgun D, Ozmen A, Unek G et al.** (2012): Triamcinolone up-regulates GLUT 1 and GLUT 3 expression in cultured human placental endothelial cells. In *Cell. Biochem. Funct.* (30(1)), S. 47–53.
- [64] **Kivinen K, Peterson H, Hiltunen L et al.** (2007): Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. In *Europ. J. Hum. Gen.* (15), S. 494–497.
- [65] **Kliman HJ, Feinberg RF** (1992): Differentiation of the trophoblast. In Barnea ER, Hustin J, Jauniaux E et al. (1992): *The first twelve weeks of gestation*. Berlin: Springer - Verlag 1992, S. 3–25.
- [66] **Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi JM et al.** (1986): Purification, Characterization, and in vitro Differentiation of Cytotrophoblasts from human Term - Placentae. In *Endocrin.* (118), S. 1567–1582.
- [67] **Knight M, Duley L, Henderson-Smart DJ et al.** (2000): Antiplatelet agents for preventing and treating pre-eclampsia. In *Cochrane Database Systemic Review* ((2):CD000492).
- [68] **Koga K, Osuga Y, Tajima T et al.** (2010): Elevated serum soluble fms-like tyrosinekinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole. In *Fertility and Sterility* (94 (1)), S. 305–308.
- [69] **Kolben M, Lopens A, Blaser J et al.** (1995): Measuring the concentration of various plasma and placenta extract proteolytic and vascular factors in pregnant patients with HELLP syndrome, pre-eclampsia and highly pathologic Doppler flow values. In *Geburtshilfliche Rundschau* (35 (Zusatz 1)), S. 126–131.
- [70] **Kumar D** (1962): Chronic placental ischemia in relation to toxemias of pregnancy. A preliminary report. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (84), S. 1323–1329.
- [71] **Kwon JY, Bai SW, Kwon YG et al.** (2010): The effect of nicotine on the production of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin in human umbilical vein endothelial cells and trophoblasts. In *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* (89(4)), S. 565–571.

- [72] **Lam C, Lim KH, Karumanchi S** (2005): Circulating Angiogenic Factors in the Pathogenesis and Prediction of Preeclampsia. In *Hyperten. Res.* (46), S. 1077–1085.
- [73] **Levine RJ** (2005): Urinary Placental Growth Factor and Risk of Preeclampsia. In *JAMA* (293), S. 77–85.
- [74] **Levine RJ, Lam C, Qian C et al** (2006): Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. In *N. Eng. J. Med.* (335(10)), S. 992–1005.
- [75] **Lindheimer MD, Kanter D** (2010): Interpreting abnormal proteinuria in pregnancy: the need for a more pathophysiological approach. In *Obstet. Gynecol.* (115 (2 Pt 1)), S. 365–375.
- [76] **Lindqvist P, Marsal K** (1999): Moderate smoking during pregnancy is associated with a reduced risk of preeclampsia. In *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* (78(8)), S. 693–697.
- [77] **Lockwood CJ, Peters JH** (1990): Increased plasma levels of ED1 cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (162), S. 358–362.
- [78] **Lüllmann-Rauch R** (2006): *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2006.
- [79] **Magee LA, Miremadi S, Li J et al.** (2005): Therapy with both magnesium sulfate and nifedipine does not increase the risk of serious magnesium-related maternal side effects in women with preeclampsia. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (193), S. 153–163.
- [80] **Mandl M, Ghaffari-Tabrizi N, Haas J et al.** (2006): Differential glucocorticoid effects on proliferation and invasion of human trophoblast cell lines. In *Reproduct.* (132(1)), S. 159–167.
- [81] **Maruyama I, Bell CE, Majerus PW** (1985): Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. In *J. Cell. Biol.* (101), S. 363–371.
- [82] **Masotti G, Poggesi L, Galanti G et al.** (1979): Differential Inhibition of Prostacyclin Production and Platelet Aggregation by Aspirin. In *Lancet* (314), S. 1213–1216.
- [83] **Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M et al.** (2007): Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. In *Am. J. Perinatol.* (24), S. 257–266.
- [84] **Matthews SG, Owen D, Kalabis G et al** (2004): Fetal glucocorticoid exposure and hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) function after birth. In *Endocr. Res.* (30), S. 827–836.

- [85] **Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R et al.** (2005): Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 and Endothelial Dysfunction in the Pathogenesis of Preeclampsia. In *Pediat. Res.* (57(5;2)), S. 1R - 7R.
- [86] **Maynard SE, Min JY, Merchan J et al.** (2003): Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. In *J. Clin. Invest.* (111), S. 649–658.
- [87] **Mitchell EA, Thompson J, Robinson E et al.** (2002): Smoking, nicotine and tar and risk of small for gestational age babies. In *Acta Paediatrica* (91(3)), S. 323–328.
- [88] **Mohan S** (2002): Effects of cigarette smoke on the immune system. In *Nature Reviews Immunology* (5), S. 372–377.
- [89] **Moll UM, Lane BL** (1990): Proteolytic activity of first trimester human placenta localisation of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast. In *Histochem. Cell. Biol.* (94), S. 555–560.
- [90] **Murphy SR, LaMarca BBD, Parrish M et al.** (2013): Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor- α . In *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (304(2)), S. R130-R135.
- [91] **Nafstad P, Fugelseth D, Qvigstad E et al.** (1998): Nicotine concentration in the hair of nonsmoking mothers and size of offspring. In *Am. J. Public Health* (88(1)), S. 120–124.
- [92] **Nelson DM, Walsh SW** (1989): Aspirin differentially affects thromboxane and prostacyclin production by trophoblast and villous core compartments of human placental villi. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (161(6 Pt 1)), S. 1593-1598.
- [93] **Nova A, Sibai BM, Barton JR et al.** (1991): Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (165), S. 724–727.
- [94] **O'Brien J, White W, Baldwin E et al.** (2013): 630: Flt-1 expressing microparticle levels correlate with plasma sFlt-1 concentrations and may contribute to VEGF regulation in preeclampsia. In *33rd Annual Meeting of the Society for Maternal-Fetal Medicine* (208(1, Supplement)), S. S267.
- [95] **Ohkuchi A, Hirashima C, Suzuki H et al.** (2010): Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sFlt-1 and PlGF levels in women with preeclampsia. In *Hypertens. Res.* (33(5)), S. 422–427.
- [96] **Olsen SF, Secher NJ, Tabor A et al.** (2000): Randomised clinical trials of fishoil supplementation in high risk pregnancies. Fish Oil Trials In Pregnancy. In *Br. J. Obstet. Gynaecol.* (107), S. 382–395.

- [97] **Page EW** (1939): The relation between hydatid moles, relative ischemia of the the gravid uterus and the placental origin of eclampsia. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (37), S. 291–293.
- [98] **Ravi T, Kisner T, Hagmann H et al.** (2011): Pilot Study of Extracorporeal Removal of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 in Preeclampsia. In *Circul.* (124), S. 940–950.
- [99] **Reinisch JM, Simon NG, Karow WG et al.** (1978): Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. In *Science* 202 (4366), S. 436–438.
- [100] **Robertson WB, Brosens IA, Dixon HG** (1967): The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. In *J. Pathol. Bacteriol.* (93), S. 581–592.
- [101] **Robillard P, Dekker G, Chaouat G et al.** (2011): Epidemiological studies on primipaternity and immunology in preeclampsia – a statement after twelve years of workshops. In *Special Section: Seventh International Workshop on Reproductive Immunology, Immunological Tolerance and Immunology of Preeclampsia, Tioman Island, Malaysia* (89(2)), S. 104–117.
- [102] **Roche Diagnostics GmbH** (2005): Cell Proliferation Kit I (MTT).
- [103] **Roche Diagnostics GmbH** (2011): Cytotoxicity Detection Kit (LDH).
- [104] **Romani F, Lanzone A, Tropea A et al.** (2011): Nicotine and cotinine affect the release of vasoactive factors by trophoblast cells and human umbilical vein endothelial cells. In *Placen.* (32 (2)), S. 153–160.
- [105] **Rotchell YE, Cruickshank JK, Gay MP et al.** (1998): Barbados Low Dose Aspirin Study in Pregnancy (BLASP): a randomised trial for the prevention of pre-eclampsia and its complications. In *Br. J. Obstet. Gynaecol.* (105(3)), S. 286–292.
- [106] **Samangaya RA, Mires G, Shennan A et al.** (2009): A Randomised, Double-Blinded, Placebo-Controlled Study of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor Sildenafil for the Treatment of Preeclampsia. In *Hypertens. Pregnancy* (28(4)), S. 369–382.
- [107] **Schumacher GH** (1993): *Embryonale Entwicklung und Fehlbildungen des Menschen. Anatomie und Klinik. 10. Auflage Band 1.* Berlin: Verlag Ullstein/Mosby 1993.
- [108] **Seckl JR** (2004): Prenatal glucocorticoids and long-term programming. In *European Journal of Endocrinology* (151(Suppl 3)), S. U49.
- [109] **Shembrey MA, Noble AD** (1995): An instructive case of abdominal pregnancy. In *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynaecol.* (35), S. 220–221.
- [110] **Sibai BM, Ramadan MK, Usta I et al.** (1993): Maternal morbidity Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (169), S. 1000–1006.

- [111] **Sibai BM** (1998): Prevention of preeclampsia: A big disappointment. In *Am. J. Obstet. Gynaecol.* (179(5)), S. 1275–1278.
- [112] **Sibai BM, Dekker G, Kupfermine M** (2005): Pre-eclampsia. In *Lancet* (365), S. 785–799.
- [113] **Simpson ER, MacDonald PC** (1981): Endocrine Physiology of the Placenta. In *Annu. Rev. Physiol* (43(1)), S. 163–188.
- [114] **Sloboda DM, Challis JRG, Moss TJM et al.** (2005): Synthetic Glucocorticoids: Antenatal Administration and Long-term Implications. In *Current Pharmaceutical Design* (11(11)), S. 1459–1472.
- [115] **Slone D, Heinonen O, Kaufman D et al.** (1976): Aspirin and Congenital Malformations. In *Lancet.* (1), S. 1373–1375.
- [116] **Smith GC, Pell JP, Walsh D** (2001): Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. In *Lancet* (356), S. 2002–2006.
- [117] **Speeg KV, Harrison RW** (1979): The ontogeny of the human placental glucocorticoid receptor and inducibility of heat-stable alkaline phosphatase. In *Endocrinology* (104), S. 1364–1368.
- [118] **Steegers EAP, Daddelen P, Duvekot JJ et al.** (2010): Pre-eclampsia. In *Lancet* (376 (9741)), S. 631–644.
- [119] **Stewart PM, Murry BA, Mason JI** (1994): Human kidney 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform. In *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (79(2)), S. 480–484.
- [120] **Taniguchi T, Muramatsu I** (2003): Pharmacological knockout of endothelin ETA receptors. In *4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects* (74(2–3)), S. 405–409.
- [121] **Thorp JA, Walsh SW, Brath PC** (1988): Low-dose aspirin inhibits thromboxane, but not prostacyclin, production by human placental arteries. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (159(6)), S. 1381–1384.
- [122] **Tubbergen P, Lachmeijer AM, Althuisius SM et al.** (1999): Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparous women? In *J. Reprod. Endocrin.* (45), S. 81–88.
- [123] **Ulfig N** (2005): *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2005.

- [124] **Unek G, Ozmen A, Kipmen-Korgun D et al.** (2012): Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. In *Acta Histochemica* (114(1)), S. 31–40.
- [125] **Universität Köln** (2010): Uniklinik Köln vor Durchbruch bei „Schwangerschaftsvergiftung“ – Weltweit erste erfolgreiche Behandlung einer Präeklampsie. Pressemitteilung vom 25.05.2010
- [126] **van Berends AL, Bertoli-Avella AM, Groot CJ et al.** (2007): STOX1 gene in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. In *Br. J. Obstet. Gynaecol.* (114), S. 1163–1167.
- [127] **van Dijk ML, Mulders J, Poutsma A et al.** (2005): Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. In *Nat. Genet.* (37), S. 514–519.
- [128] **Venkatesha S, Toporsian M, Lam C et al.** (2006): Soluble endogelin contributes the pathogenesis of preeclampsia. In *Nat. Med.* (12), S. 642–649.
- [129] **Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O et al.** (2012): The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. In *Am. J. Obstet. Gynecol.* (206(1)), S. 58.e1-8.
- [130] **Villa PM, Kajantie E, Räikkönen K et al.** (2013): Aspirin in the prevention of pre-eclampsia in high-risk women: a randomised placebo-controlled PREDO Trial and a meta-analysis of randomised trials. In *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 120 (1), S. 64–74.
- [131] **Vitoratos N, Hassiakos D, Iavazzo C** (2012): Molecular Mechanisms of Preeclampsia. In *J. Preg. 2012* , S. 1–5.
- [132] **Walker JJ** (2000): Pre-eclampsia. In *Lancet* (356(9237)), S. 1260–1265.
- [133] **Warkentin B** (1994): Fetal development in late gestosis and nicotine consumption. In *Geburtshilfe Frauenheilkd* (54(5)), S. 262-267.
- [134] **Wikstrom AK, Stephansson O, Cnattingius S** (2010): Tobacco Use During Pregnancy and Preeclampsia Risk: Effects of Cigarette Smoking and Snuff. In *Hyperten.* (55(5)), S. 1254–1259.
- [135] **World Health Organisation** (2005): Make Every Mother and Child Count. In World Health Organisation (2005): *The World Health Report*. Genf 2005.

- [136] **Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F** (2010): A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. In *J. Cell. Mol. Med.* (14(3)), S. 528–552.
- [137] **Young BC, Levine R, Karumanchi SA** (2010): Pathogenesis of Preeclampsia. In *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (5), S. 173–192.
- [138] **Yuan HA, Haig D, Karumanchi SA** (2005): Angiogenic Factors in the Pathogenesis of Preeclampsia. In *Curr. Top. Devel. Bio.* (77), S. 297–312.
- [139] **Zhou CC, Ahmad S, Mi T et al** (2008): Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. In *Hyperten.* (51(4)), S. 1010–1019.
- [140] **Zhou Y, McMaster M, Woo K et al.** (2002): Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. In *Am. J. Pathol.* (160), S. 1405–1423.
- [141] **Zhu X, Wu S, Dahut WL et al.** (2007): Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. In *Am. J. Kid. Dis.* (49(2)), S. 186–193.

9 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Soweit nicht gesondert ausgewiesen sind alle Fotos, Grafiken und Tabellen vom Autor für diese Arbeit erstellt worden.

- Abb.1** Beginnende Proliferation der Trophoblastzellen in der Uteruswand modifiziert nach Schumacher 1993: S. 77.
- Abb. 2** Entwicklung der Zotten während der Plazentation aus Schumacher 1993: S. 126.
- Abb. 3** Aufbau der Plazenta in ca. der 4. Woche aus Ulfig 2005: S. 35.
- Abb.4** Makroskopische Ansicht der Plazenta (rot) aus Schumacher 1993: S. 127.
- Abb. 5** Schematischer Überblick über die Plazenta aus Schumacher 1993: S. 129.
- Abb. 6** Zottenquerschnitt von Zotte bis zum 4. Monat (a) und einer Zotte im 4. Monat (b) aus Ulfig 2005: S. 37
- Abb. 7** Plazenta kurz nach der Geburt mit Blick auf den maternalen Anteil,
- Abb. 8** molekulare Unterschiede zwischen Flt -1 und sFlt -1 modifiziert nach Maynard 2005.
- Abb. 9** Wirkmechanismus von sFlt -1 modifiziert nach Yuan 2005.
- Abb. 10** Übersicht über die Pathogenese der Präeklampsie mit Fokus auf das Protein sFlt -1 (lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase 1), HIF-1 = Hypoxie induzierter Faktor 1, VEGF-A = Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor, PIGF = Plazentärer Wachstumsfaktor, vW-Faktor = von Willebrand Faktor, IL-6 = Interleukin 6, TNF- α = Tumornekrosefaktor α , AT1-AA = Angiotensin Rezeptor 1 Autoantikörper, ET-1 = Endothelin 1, NO = Stickstoffmonoxid
- Abb. 11** Überblick über den Ablauf der Präparation von Trophoblastzellen aus Plazentamaterial modifiziert nach Kliman 1992.
- Abb. 12** Prinzip der Percoll Gradientenzentrifugation nach Contractor 1993.

- Abb. 13** Entwicklung von Synzytiotrophoblastzellen modifiziert nach Kliman 1986.
- Abb. 14** Zusammenfassendes Schemata zum Prinzip des LDH – Zytotoxizitätstest
- Abb. 15** Schema der Reaktion die dem Cell Proliferation Kit 1 zugrundeliegt aus Roche Diagnostics GmbH 2005
- Abb. 16** Syntzytium von Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation, 32x Vergrößerung
- Abb. 17** Trophoblastzellen nach 4 Stunden Inkubation mit MTT – Lösung, 32x Vergrößerung
- Abb. 18** Trophoblastzellkultur nach Auflösung von Formazansalzkrystallen, 32x Vergrößerung
- Abb. 19** Immunhistochemisch markierte Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation, 32x Vergrößerung
- Abb. 20** Immunhistochemisch markierte Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation, 32x Vergrößerung
- Abb. 21** Trophoblastzellen vor ihrer Inkubation. 32x Vergrößerung
- Abb. 22** Trophoblastzellen nach 24 Stunden Inkubation in einer zusatzfreien Kultur, 32x Vergrößerung
- Abb. 23** Trophoblastzellen nach 48 Stunden Inkubation in einer zusatzfreien Kultur, 32x Vergrößerung
- Abb. 24** Trophoblastzellen nach 72 Stunden Inkubation in einer zusatzfreien Kultur, 32x Vergrößerung
- Abb. 25** Trophoblastzellkultur nach Nikotinamplikation und 72 h Inkubationszeit 32x Vergrößerung

- Abb. 26** Grafische Darstellung der Expression von sFlt -1 in den Kulturen aus Normschwangerschaftsplazenten (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb. 27** Grafische Darstellung der Expression von sFlt -1 in den Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaftsmaterial (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb.- 28.** sFlt -1 Konzentrationen nach 72 h Inkubation mit Standardabweichung. KW= Kontrollwert ohne Substanz, NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l
- Abb. 29** Grafische Darstellung der gemittelten Östradiolkonzentrationen in Kulturen aus Normschwangerschaften im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb. 30** Grafische Darstellung der gemittelten Östradiolkonzentrationen in Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb. 31** Grafische Darstellung der gemittelten Progesteronkonzentrationen in Kulturen aus Normschwangerschaften im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb. 32** Grafische Darstellung der gemittelten Progesteronkonzentrationen in Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft im Verlauf der Versuche (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb. 33** Grafische Darstellung der Entwicklung von pH – Werten im Nährmedium während der 72 stündigen Inkubation in Kulturen aus Normschwangerschaften (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb. 34** Grafische Darstellung der Entwicklung von pH – Werten im Nährmedium während der 72 stündigen Inkubation in Kulturen aus Präeklampsieschwangerschaft (ASS = Acetylsalicylsäure)
- Abb. 35** Glucosekonzentrationen der getesteten Substanzen nach 72 Stunden Inkubation in Kulturen aus Normschwangerschaften mit Standardabweichung, KW = Kontrollwert ohne Zusätze, NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l

Abb. 36 Errechnete Vitalität der Kulturen aus Normschwangerschaften in Beziehung zum Vergleichswert (= 100 %) , NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l

Abb. 37 Durchschnittliche Zytotoxizität der getesteten Substanzen in Kulturen aus Normschwangerschaften in Beziehung zum Vergleichswert (= 100%), NI H = Nikotin in hoher Konzentration, NI L = Nikotin in geringerer Konzentration, ASS H = ASS in hoher Konzentration, ASS L = ASS in geringerer Konzentration, TA = Triamcinolon 0,06 mol/l

Tabellen

Tab. 1 Schemata zur Anfertigung des Percoll – Gradienten.

Tab. 2 Konzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen

Tab. 3 Bestandteile der Lösungen des Elecsys 2010 Kits zur Bestimmung der sFlt -1 Konzentrationen

Tab.4 gemittelte Östradiolkonzentrationen der Kulturen aus Normschwangerschaftsplazenten

Tab. 5 gemittelte Östradiolkonzentrationen der Kultur aus Präeklampsieschwangerschaft

Tab. 6 gemittelte Progesteronkonzentrationen der Kultur aus Normschwangerschaftsplazenten

Tab. 7 gemittelte Progesteronkonzentrationen der Kultur aus Präeklampsieschwangerschaftmaterial

10 Anhang

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 11.06.2014

Ferdinand Schumacher

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in den Jahren 2010 – 2014 im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock. Allen die mich in dieser Zeit unterstützt haben möchte ich im Folgenden sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. habil. V. Brieske danke ich für das Überlassen des Dissertationsthemas und für seine großzügige Unterstützung in der Universitätsfrauenklinik Rostock.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter die mich, als Leiterin des Forschungslabors, maßgeblich betreute, mit großer Erfahrung anleitete und zu jeder Tages- und Nachtzeit für Rückfragen zur Verfügung stand.

Des Weiteren danke ich dem Team des Forschungslabores, das es mir ermöglichte, meine Versuche in angenehmer und kollegialer Atmosphäre durchzuführen und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Besonderer Dank gilt hier Frau E. Greschkowitz.

Den Mitarbeitern des Kreißsaales danke ich dafür, dass sie meine Arbeit trotz des hektischen Berufsalltages nicht aus dem Gedächtnis verloren haben und mich in der Akquise des Plazentamaterials tatkräftig unterstützten.

Danken möchte ich ebenfalls Frau Claudia Janoska für die gewissenhafte formale Durchsicht der Arbeit und das geduldige Beantworten der vielen Rückfragen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die nicht nur durch konstruktive Kommentare zur Dissertation und deren Gelingen beitrugen, sondern mir auch oft Zeit und Raum schufen, um mich gewissenhaft mit der Arbeit auseinanderzusetzen zu können.

Vortrag und Poster

1. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Greifswald, Mai 2011, Poster
2. 25. Deutscher Kongress für Perinatale Medizin, Berlin, Dezember 2011, Vortrag

Funktionelle Untersuchungen an Trophoblastzellkulturen zur Prophylaxe und eventueller Therapie der Präeklampsie

Schumacher. F., Briese V., Richter D. – U.

Einleitung

Die Preeklampsie ist für jeden dritten Fall schwerer geburtshilflicher Morbidität, für eine fünfmal gesteigerte perinatale Mortalität und für weltweit mindestens 50 000 mütterliche Todesfälle jährlich verantwortlich. Trotz den schweren Folgen dieser Erkrankung stehen heute noch keine effizient wirksamen Mittel zur Prophylaxe oder zur Therapie zur Verfügung. In dieser Studie sollte an Trophoblastzellkulturen untersucht werden, ob es mögliche Substanzen gibt die das Präeklampsierisiko verringern und eventuell zur Therapie eingesetzt werden könnten. Als Marker für die Verringerung der Präeklampsiehäufigkeit wurde der VEGF – Rezeptorantagonist sFlt – 1 (soluble fms – like tyrosine kinase 1) genutzt, der maßgeblich an der Pathogenese der Preeklampsie beteiligt sein soll (siehe Grafik rechts). Zur gleichzeitigen Überprüfung der Plazentafunktion wurden die Konzentrationen der Hormone Östradiol und Progesteron bestimmt.

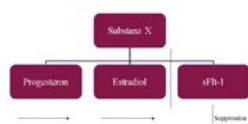


Bild 1. Schema des Versuchsaufbaus

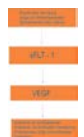
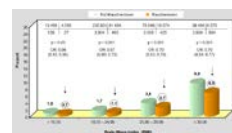


Bild 2. Pathogenese der Preeklampsie

Es wurden 3 Substanzen untersucht. Als einzig bekanntes und leider nur bedingt wirksames Präparat wird Acetylsalicylsäure zur Prophylaxe der Preeklampsie genutzt. Auch ist bekannt, dass mütterliches Rauchen vor und während der Schwangerschaft das Präeklampsierisiko stark vermindert. Hier sollte Nikotin näher betrachtet werden. Desweiteren stand das zur Krebstherapie eingesetzte Cortison Triamcinolon zur Untersuchung, da es ebenfalls Effekte auf die Entwicklung der Preeklampsie haben sollte.



Grafik 1. Häufigkeit Preeklampsie bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen unter Berücksichtigung des mütterlichen BMI

Material und Methoden

Untersucht wurden 5 Trophoblastzellkulturen. Diese wurden aus 5 Termin Plazenten nach der Methode von Jeschke et al. isoliert. Anschließend wurden die Trophoblastzellen in Wellplatten (ca. 2 Mill. Zellen/Well) kultiviert und mit den zu untersuchenden Substanzen (je 3 Wells mit 3×10^4 μ M Nikotin, mit 5×10^{-2} M Acetylsalicylsäure und 60 μ M Triamcinolon) versehen. Ein Well blieb als Kontrolle ohne Zusätze. Die Kulturen wurden dann bei 37 °C inkubiert. Nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h wurden die entsprechenden Synthesenbildungen fotografiert, der pH – Wert in den verschiedenen Wells gemessen und die ab zentrifugierten Überstände aus den Wells für die Hormonspiegelbestimmung und für die sFlt – 1 Testung vorbereitet. Die sFlt – 1 Werte wurden mit einem handelsüblichen ELISA der Firma R u. D. Systems bestimmt.

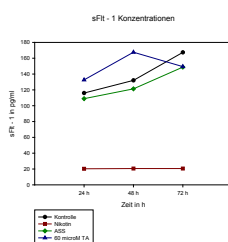


Bild 3. geborene Plazenta

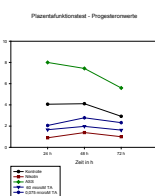
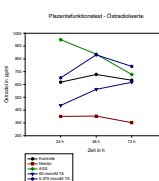
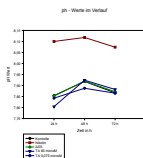


Bild 4. Synzytienbildung nach 72 h

Ergebnisse



Die Ergebnisse der Messungen des sFlt – 1 Spiegel in den Überständen zeigen eine hochsignifikante Verminderung der sFlt – 1 Konzentration unter Nikotinapplikation. Obwohl es bei ASS Gabe ebenfalls im Kontrollwert zu erwarteten Anstiegen kommt, bleibt der sFlt – 1 Spiegel unter Nikotin konstant niedrig. Triamcinolon erhöht die sFlt – 1 Konzentration bis zur 48 h Messung zunächst. Dann kommt es jedoch bei der 72 h Messung zu einem Konzentrationsabfall.



Der Plazentafunktionstest ergab sowohl bei den Östradiol -, als auch bei den Progesteronkonzentrationen eine signifikante Verminderung der Spiegel unter Nikotingabe. Ebenfalls verminderte Progesteronkonzentrationen wurden bei beiden Triamcinolonkonzentrationen gefunden. Bei Östradiol hatte die höhere Triamcinolonkonzentration einen verminderten Einfluss, während bei der geringer konzentrierten Variante eine leichte Erhöhung der Östradiolkonzentration zu verzeichnen war. ASS hatte bei keiner der gemessenen Hormonkonzentrationen einen negativen Einfluss. Der pH – Wert war nur bei Nikotin signifikant erhöht.

Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Nikotin ein effektives Mittel darstellt, um die Konzentration des Präeklampsie verursachenden Protein sFlt – 1 zu verringern. Dies erklärt die verringerte Inzidenz von Preeklampsie unter schwangeren Raucherinnen. Leider besteht Nikotin den Plazentafunktionstest nicht, was sich in den stark verringerten Hormonspiegeln und dem erhöhten pH – Wert zeigt. Daher kommt Nikotin zur Therapie oder zur Prophylaxe der Preeklampsie nicht in Frage. Hier kann jetzt jedoch nach eventuellen Struktur- und/oder Wirkanaloga gesucht werden. ASS, als bisher einzige wirksame Therapieform der Preeklampsie, stellte sich als in keiner Form als Plazentaschädlich heraus. Allerdings konnte hier nur eine weit weniger signifikante Verringerung der sFlt – 1 Spiegel unter ASS Gabe festgestellt werden. Dies erklärt unter anderem, dass die Preeklampsie durch ASS nicht effektiv behandelt werden kann. Triamcinolongabe, das ebenfalls verstärkt zur Tumorthherapie untersucht wird, hatte keine positive Wirkung auf die placentaren Hormonspiegel und es zeigte sich in unserem 3 – tägigen Versuchszeitraum keine Verminderung der sFlt – 1 Spiegel. Es ist daher zur Therapie der Preeklampsie nicht zu empfehlen. Als nächster Schritt unserer Untersuchung werden wir, eine weitere Versuchsreihe mit Plazenten aus Präeklampsieschwangerschaften durchführen um unsere bisherigen Ergebnisse zu überprüfen und um zusätzlich zu einer möglichen Prophylaxefragestellung der Frage nach einer effizienteren Therapie nachzugehen.